

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Détection des OGM sur biochips par la technique de la Cycling Probe Technology

Louis, Katy

*Award date:*  
2002

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



---

**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX  
NAMUR**

**Faculté des Sciences**

**DETECTION DES OGM SUR BIOCHIPS PAR LA TECHNIQUE  
DE LA CYCLING PROBE TECHNOLOGY**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
licencié en Sciences biologiques**

LOUIS Katy  
Juin 2002

**Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix**  
**FACULTE DES SCIENCES**  
Secrétariat du Département de Biologie.  
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR  
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20  
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

**DETECTION DES OGM SUR BIOCHIPS PAR LA TECHNIQUE  
DE LA CYCLING PROBE TECHNOLOGY**

LOUIS Katy

Résumé

Les plantes génétiquement modifiées sont de plus en plus présentes sur le marché et ce n'est, semble-t-il, pas prêt de s'estomper. Face à cet accroissement, il est nécessaire de développer des techniques de détection fiables et quantitatives en vue de contrôler la composition des aliments et d'en assurer l'étiquetage. Une des technologies utilisable dans ce but est celle des biochips, technologie que nous utiliserons dans ce mémoire. Grâce à celle-ci, il est possible d'analyser simultanément plusieurs gènes et donc de détecter la présence éventuelle de plusieurs OGM. Afin d'atteindre une sensibilité suffisante, une technique d'amplification est indispensable avant l'analyse sur biochips. Nous avons choisi d'utiliser ici la technique de la CPT (Cycling Probe Technology). Cette technique est avantageuse à différents niveaux : elle ne nécessite qu'une seule température et ne requiert donc pas d'appareillage coûteux ; il n'y a pas de risque de contamination, et la quantification est possible. La CPT repose sur l'utilisation d'une sonde chimérique, c'est-à-dire constituée d'ADN/ARN/ADN marquée dans ce cas-ci par une biotine en 3' et une cyanine 3 en 5', et de la RNase H, qui clive spécifiquement les hybrides ADN/ARN formés par l'hybridation de la sonde à son cible. La sonde chimérique est donc clivée en deux petites sondes qui vont se détacher spontanément du cible et le laisser libre pour une autre hybridation. C'est l'accumulation de la sonde clivée portant le signal de détection qu'il nous faut mesurer. Un épuisement sur surface coatée à la streptavidine retiendra alors les sondes intactes biotinylées et permettra de récupérer les sondes clivées portant une cyanine 3. Ces dernières pourront être détectées suite à l'hybridation sur biochips grâce à un scanner qui viendra exciter le fluorochrome.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2002

**Promoteur:** J. REMACLE

## **Remerciements**

En janvier, on s'installe, on découvre la vie de laboratoire et on se dit que le mois de juin est encore très loin. Mais la fin est déjà là et ces derniers mois, je ne les ai pas vu passer... Un mémoire, c'est court!

Le mémoire est une expérience inoubliable à laquelle bien des personnes contribuent de quelconques manières.

Je tiens tout d'abord à remercier Madame Raes de m'avoir accueillie au sein du laboratoire.

Je remercie également le Professeur Remacle, promoteur de ce mémoire qui m'aura passionnée de bout en bout.

Un merci tout particulier à Stéphanie et Anne-Catherine pour leurs conseils, leur disponibilité, leur gentillesse, leur patience. Merci d'avoir prêté du temps à répondre à mes questions mais également de m'avoir guidée lors de la rédaction. Désolé de vous avoir pris du temps à une époque marquée par autant d'heureux événements. Merci.

Merci aux autres de l'équipe ☐ Valérie et Patrice.

Merci également à Martine pour m'avoir assistée lors du travail en radioactivité.

Merci à Marc pour les très nombreux dépannages informatiques.

Merci à l'ensemble des membres du laboratoire dont je ne peux citer tous les noms sans risquer d'en oublier. Que ce soit pour des conseils, pour leur sympathie, pour les petites discussions pendant les pauses ou les temps d'incubation... On se sent bien dans un tel cadre de travail.

Merci aussi à l'ensemble des mémorants pour les bons moments passés dans notre « ☐cage☐ ».

Je tiens également à remercier papa et maman pour leur soutien tout au long de ces études ainsi que leur confiance. Merci aussi à mon frère et ses grands conseils (!).

Merci à papounet et mamouchka pour leur soutien également.

Et pour finir un tout grand merci à Geoffroy de m'avoir supportée et encouragée... Cela n'a pas été facile tous les jours. Merci pour tout.

Merci à tous ☐!

## **Liste des abréviations**

3SR	Self sustained sequence replication
A	Adénosine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AMV	Avian myeloblastosis virus
APS	Amonium persulfate
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BSA	Bovine serum albumine
°C	Degré Celsius
C	Cytosine
CB	Cycling buffer
CE	Communauté européenne
CPR	Cycling probe reaction
CPT	Cycling probe technology
Cy2b2	Cytochrome 2b2
D	Longueur du duplex
EDTA	Ethylène diamine tétraacétate de sodium
fmole	fentomole ( $10^{-15}$ moles)
G	Guanine
g	gramme
HRP	Horse radish peroxydase
IgG	Immunoglobuline G
INV	Invertase
Kcal	Kilocalorie
K <sub>D</sub>	Constante de dissociation
LCR	Ligase chain reaction
Log	Logarithme
Lys	Lysine

M	Molaire
MDV-1	Midivariant-1
mg	milligramme
ml	millilitre
µg	microgramme
µl	microlitre
µM	micromolaire
µm	micromole
NASBA	Nucleic acid sequence-based amplification
NaBH <sub>4</sub>	Sodium borohydride
nM	nanomolaire
nm	nanomètre
OGM	Organisme génétiquement modifié
P	Rapport de mésappariements
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase chain reaction
Phe	Phénylalanine
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SSC	Sodium saline citrate
RFU	Relative Fluorescent Unit
RNase A	Ribonucléase A
RNase H	Ribonucléase H
Rpm	Rotation par minute
RRS	Roundup ready soja
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase
T	Thymidine
TAS	Transcription-based amplification system
TBE	Tris borate éthylène diamine tétra acétique
TEMED	N, N, N', N'-tetra-méthyl-éthylènediamine
Tm	Temperature de Melting
Tween	Polyoxyéthylène sorbitan monolaurate
UV	Ultra-violet
V	Volt
WB	Washing buffer

## Table des matières

	<u>Introduction</u> .....	1
I.	<u>Les OGM</u> .....	1
I.1.	<u>Introduction</u> .....	1
I.2.	<u>Divergences de positions</u> .....	2
I.3.	<u>Peur de quoi ?</u> .....	3
I.4.	<u>L'étiquetage : une nécessité</u> .....	4
I.5.	<u>Méthodes de détection des OGM</u> .....	6
II.	<u>LES TECHNIQUES D'AMPLIFICATIONS</u> .....	7
II.1.	<u>La PCR (Polymerase Chain Reaction)</u> .....	8
II.2.	<u>La LCR (Ligase Chain Reaction)</u> .....	10
II.3.	<u>La TAS (transcription-based amplification system)</u> .....	11
II.4.	<u>La Q<math>\square</math> replicase</u> .....	12
II.5.	<u>La CPT (Cycling Probe Technology)</u> .....	13
II.5.1.	<u>Principe</u> .....	13
II.5.2.	<u>La ribonucléase H</u> .....	14
II.5.3.	<u>Méthodes de détection des produits de la CPT</u> .....	15
	a) <u>La radioactivité</u> .....	15
	b) <u>La chémoluminescence et la luminescence</u> .....	16
	c) <u>Le « strip assay »</u> .....	17
III.	<u>L'hybridation</u> .....	18
III. 1.	<u>Notions de base et principes</u> .....	18
III.2.	<u>Les sondes nucléiques</u> .....	19
III.3.	<u>Les facteurs influençant l'hybridation</u> .....	20
III.3.1.	<u>La température</u> .....	21
III.3.2.	<u>La force ionique</u> .....	21
III.3.3.	<u>La composition de la chaîne</u> .....	22
III.3.4.	<u>La taille de la sonde</u> .....	22
III.3.5.	<u>La viscosité</u> .....	22
III.3.6.	<u>La formamide</u> .....	22
III.3.7.	<u>La présence de mésappariements</u> .....	23
III.4.	<u>Les facteurs influençant la stabilité des hybrides</u> .....	23
III.4.1.	<u>La concentration en sels</u> .....	23
III.4.2.	<u>La composition</u> .....	24
III.4.3.	<u>La longueur de la chaîne (du duplex) (D)</u> .....	24
III.4.4.	<u>Les mésappariements (P)</u> .....	24
III.4.5.	<u>En bref</u> .....	24
III.5.	<u>Stratégies d'hybridation</u> .....	25
III.5.1.	<u>Hybridation en solution</u> .....	25
III.5.2.	<u>Hybridation sur support solide</u> .....	26
	a) <u>Sur filtre</u> .....	26
	b) <u>Sur plaque de polystyrène</u> .....	27
III.5.3.	<u>In situ</u> .....	28
IV.	<u>Les biochips : une nouvelle tendance</u> .....	28
IV.1.	<u>Présentation de cette technologie</u> .....	28
IV.2.	<u>Principe des biochips</u> .....	29
IV.3.	<u>Les supports</u> .....	30
IV.4.	<u>Fabrication du damier</u> .....	31

IV.5. Détection sur biochips	31
IV.6. Les applications	32
IV.6.1. L'identification d'une séquence génomique	32
IV.6.2. L'expression des gènes	33
V. Objectif du mémoire	34
Matériel et méthodes	
I. Description des sondes utilisées	38
I.1. Sonde IVcya/biot	38
I.2. Sonde IVcya	38
I.3. Capteur OTinv	38
I.4. Capteur OTCy2b2	38
I.5. Cible OCCy2b2	39
I.6. Capteur OCnf□b	39
I.7. Sonde chimérique OCSrrs1	39
I.8. Cible OCCrrs1	39
I.9. Sonde chimérique OCSrrs2	39
II. CPT	41
II.1. Principe	41
II.2. Matériel	41
II.3. Méthode	42
II.4. CPT avec détection sur gel de polyacrylamide	42
II.4.1. Principe	42
II.4.2. Matériel	43
II.4.3. Méthode	44
a) Marquage de la sonde chimérique	44
b) Purification des sondes radioactives	44
c) Préparation du gel dénaturant	45
d) Amplification par CPT et détection sur gel de polyacrylamide	45
III. Epuisement sur puits coatés à la streptavidine	46
III.1. Principe	46
III.2. Matériel	46
III.3. Méthode	47
III.4. Quantification de sondes par l'OliGreen	48
IV. Epuisement sur billes magnétiques coatées à la streptavidine	49
IV.1. Principe	49
IV.2. Matériel	49
IV.3. Méthode	50
IV.3.1. Préparation des billes	50
IV.3.2. Epuisement proprement dit	50
V. Fixation des capteurs sur lame de verre (spotting)	51
V.1. Principe	52
V.2. Matériel	53
V.3. Méthode	53
a) Préparation des solutions	53
b) Spotting	54
c) Lavage des lames	54
d) Evaluation du bruit de fond	55
VI. Hybridation sur biochips	56
VI.1. Principe	56



VI.2. Matériel	56
VI.3. Méthode	57
a) Préparation du mélange d'hybridation	57
b) Hybridation proprement dite	58
c) Lavages post-hybridation et détection en fluorescence	58
d) Lavages post-hybridation et détection par précipitation à l'argent	58
VII. Détection des biochips en fluorescence	60
VII.1. Principe	60
VII.2. Méthode	60
VIII. Quantification des spots	61
VIII.1. Principe	61
VIII.2. Matériel	61
VIII.3. Méthode	61
<u>Résultats et discussions</u>	
I. Mises au point sur le gène de l'invertase du maïs	63
I.1. Tests préliminaires sur l'hybridation	63
I.1.1. Test de reconnaissance et de spécificité	63
a) Description de l'expérience	63
b) Observations	64
c) Conclusions	64
I.1.2. Test d'influence du tampon CB sur l'hybridation	65
a) Description de l'expérience	65
c) Observations	65
c) Conclusions	65
I.2. Première mise au point : l'épuisement sur puits coatés à la streptavidine	66
I.2.1. Influence du tampon	66
a) Description de l'expérience	66
b) Observations	67
c) Conclusions	67
I.2.2. Influence de la quantité de sondes par puits	68
a) Description de l'expérience	68
b) Observations	68
c) Conclusions	69
I.2.3. Influence de la température et du temps	69
a) Description de l'expérience	69
b) Observations	70
c) Conclusions	70
I.2.4. Influence de l'agitation	70
a) Description de l'expérience	70
b) Observations	71
c) Conclusions	71
I.2.5. Réalisation d'un double épuisement	71
I.2.6. Epuisement sur puits coatés suivi d'une hybridation sur biochips	72
a) Description de l'expérience	72
b) Observations	72
c) Conclusions	73
I.3. Epuisement sur billes magnétiques coatées à la streptavidine	73
I.3.1. Premier test d'épuisement sur billes : influence du tampon CB	74
a) Description de l'expérience	74
b) Observations	74

<u>c) Conclusions</u>	75
<u>I.3.2. Augmentation du nombre d'épuisements</u>	75
<u>a) Description de l'expérience</u>	75
<u>b) Observations</u>	76
<u>c) Conclusions</u>	76
<u>I.3.3. Influence d'une augmentation du volume de la réaction</u>	76
<u>I.3.4. Influence de l'agitation</u>	77
<u>I.3.5. Influence du triton</u>	78
<u>I.3.5.1. Sondes diluées dans de l'eau + triton</u>	78
<u>a) Description de l'expérience</u>	78
<u>b) Observations</u>	78
<u>c) Conclusions</u>	78
<u>I.3.5.2. Sondes diluées dans du tampon CB sans triton</u>	79
<u>a) Description de l'expérience</u>	79
<u>b) Observations</u>	79
<u>c) Conclusions</u>	79
<u>I.4. Mise en évidence des produits de la CPT sur biochips</u>	80
<u>II. Préliminaires sur le Roundup Ready Soja</u>	83
<u>II.1. Conception théorique de la sonde chimérique</u>	83
<u>II.2. Premier test d'amplification par la CPT</u>	85
<u>a) Description de l'expérience</u>	85
<u>b) Observations</u>	86
<u>c) Conclusions</u>	86
<u>Conclusions et perspectives</u>	

## Introduction

---

### I. Les OGM

#### I.1. Introduction

Un organisme génétiquement modifié, dit OGM, est un organisme créé de manière artificielle. Le patrimoine génétique de cet organisme (plante, bactérie, etc) a été modifié par l'introduction d'un gène ayant des propriétés intéressantes, ou jugées comme telles.

Grâce aux techniques de génie génétique, un gène d'intérêt codant pour un caractère recherché va être extrait d'une autre espèce (virus, bactérie, levure, champignon, plante ou animal) puis réintroduit dans l'organisme à modifier. Pour ce faire, le gène d'intérêt est d'abord inclus dans une construction génétique comprenant promoteurs, inducteurs, terminateurs et gènes marqueurs de façon à pouvoir contrôler et amplifier l'expression de ce gène. Cette construction peut alors être introduite dans des cellules de l'hôte.

Deux techniques sont principalement utilisées pour transformer des cellules souches. La première consiste à utiliser une bactérie du sol, *Agrobacterium tumefaciens*, qui infecte de manière naturelle les dicotylédones *via* leurs blessures et entraîne le développement de tumeurs. Cette bactérie est en fait capable de transférer une séquence ADN de son plasmide comprenant les gènes responsables de la maladie, au noyau de la cellule hôte. De loin le plus utilisé (environ 64%), ce procédé de transformation assure que seule une région précisément définie soit transférée chez l'hôte (Wolfram, 1997). Toutefois, elle ne permet d'application que sur les plantes de type dicotylédones. Une autre manière de faire est l'utilisation de canons à particules. Le gène d'intérêt une fois cloné et multiplié, est fixé à la surface de particules de tungstène et projeté dans les cellules de la plante hôte. Moins utilisée (21%), moins fiable car la destination de la particule n'est pas déterminée, cette méthode a l'avantage de s'appliquer à toutes les espèces (Wolfram, 1997).

Ensuite, les plantes sont régénérées puis sélectionnées : seules celles ayant conservé la construction sont retenues. Cette sélection est rendue possible grâce au gène marqueur qui confère un caractère discriminant telle que la résistance à une substance toxique. Finalement, des tests sont réalisés en serres puis en parcelles. Ces tests ont pour but

d'évaluer à des échelles plus importantes le comportement de la nouvelle plante et les risques associés avant sa mise sur le marché. Avant sa commercialisation, tous les risques toxiques, alimentaires, écologiques, allergiques, doivent également être évalués. Une vérification de la description et de la stabilité de la construction génétique doit en plus être réalisée. L'ensemble de ces recherches peuvent s'étaler sur une dizaine d'années ( Chassy *et al.*, 2001 ; Marris, 1999 ; Wal, 2001).

Les principales caractéristiques recherchées sont en général une amélioration du produit (durabilité, pourrissement retardé, couleur, métabolisme des acides gras, ...), la résistance aux attaques de virus d'insectes ou autres et un bénéfice agronomique (système hybride, résistance aux herbicides, aux températures, au sel, ...) (Wolfram, 1997).

### **I.2. Divergences de positions**

Le recours à ces plantes dites transgéniques est à l'origine d'un véritable tollé dans le monde agricole, et dans la société en général. Alors qu'aux USA, cette pratique est devenue courante (Figure I.1), la technologie de la transgénèse soulève un mouvement de contestation très actif dans d'autres pays tels que ceux de la Communauté Européenne. Toute la société civile se trouve impliquée, ce qui donne lieu à des confrontations d'intérêts. D'une part, les agriculteurs ne peuvent trouver qu'avantageux de recourir à des organismes transgéniques, ceux-ci garantissant une meilleure résistance aux herbicides et donc un meilleur rendement. Mais chaque médaille ayant son revers, la plante qui se développera ne résistera qu'aux herbicides développés par la firme même qui aura mis au point la semence. De plus, chaque année, les agriculteurs devront racheter des semences à la firme. Les grands gagnants de cette opération sont donc essentiellement les grandes firmes adoptant ce genre de pratique. Un autre point d'achoppement lié à la culture des OGM est leurs conséquences à long terme sur l'environnement (biodiversité, monoculture) ; ce dernier point partage aussi l'opinion ( Philippon, 1997 ; Philippon, 1999).

### **I.3. Peur de quoi ?**

La dissémination des OGM dans l'environnement représente selon certains un danger à différents niveaux. Parmi les principales craintes, on peut citer : l'impact de l'utilisation accrue d'herbicides totaux sur le monde végétal sauvage, la création de produits de plus en plus toxiques, le risque de transfert de résistance entre des cultures voisines de même espèce ou apparentées, la perte de biodiversité en raison d'une tendance à l'uniformisation des cultures, etc (Marris, 1999). De fait, la transgénèse est loin d'être un processus précis, maîtrisé comme l'est un acte chirurgical. Des modifications testées en laboratoire pourraient conduire à des effets imprévisibles du comportement de la plante transgénique en champ. Dans le monde réel, de nombreuses interactions complexes ont lieu entre les différents gènes, l'environnement cellulaire et celui extérieur. Ainsi, la plante ne réagit pas forcément de manière identique en laboratoire et dans les champs : les caractéristiques écologiques, sociales et économiques sont toujours plus complexes dans le monde réel que dans les conditions normalisées d'un laboratoire (Marris, 1999). Quant aux études sur parcelles, elles sont jugées trop courtes et trop axées sur des caractéristiques économiques. Il est certain que si un risque existe, il ne mérite pas d'être pris si les nouvelles technologies ne présentent un avantage que pour les importantes sociétés industrielles.

La société a peur. Et ce qui accroît encore ses craintes, c'est la découverte, comme cela a été le cas l'été dernier, d'un fragment ADN au sein d'une séquence dont la présence n'avait pas été mentionnée par la firme développant l'organisme. L'intrus a été détecté par des chercheurs belges au sein du génome du soja génétiquement modifié (RRS) (Windels *et al.*, 2001). Les informations fournies par les firmes ne sont donc pas toujours exactes ou complètes concernant la séquence du nouvel organisme. Quelle que soit la raison de cette erreur, cela peut paraître inquiétant aux yeux de la société.

Et notre santé ? L'alimentation à partir de ces organismes génétiquement modifiés constitue-t-elle un risque pour l'homme ? Le doute s'est installé chez les consommateurs. Il est donc nécessaire de contrôler la concentration en toxines ou en facteurs antinutritionnels présents dans les aliments (Philippon, 1999).

Quant aux transferts de résistances aux bactéries de la microflore intestinale chez l'homme, l'ADN végétal étant vite dégradé dans le tube digestif humain sous l'action des

enzymes gastriques, la probabilité de transfert est faible (Perrier, 1999). La seule inquiétude réside dans le fait que des promoteurs bactériens sont régulièrement utilisés dans la construction des OGM et que donc des recombinaisons homologues avec la flore intestinale pourraient se produire.

Quant aux risques d'allergies, les modifications génétiques ne semblent pas être à l'origine d'une protéine plus allergénique que son homologue naturel. Ce risque doit être évalué de la même façon que pour toutes les protéines naturelles présentes dans les aliments. Lorsqu'une séquence homologue à un allergène connu est découverte, cela permet d'écarter la construction à risque. Mais ce n'est pas aussi facile. Un transgène peut conduire à des modifications de la teneur en certaines protéines naturellement allergéniques. En bref, rien ne permet de considérer l'OGM comme étant plus ou moins allergénique. Il faut cependant noter que l'insertion d'un gène provenant d'une autre espèce donne lieu à une protéine qui à l'origine ne se trouve pas dans l'aliment. C'est pourquoi les consommateurs allergiques qui doivent et sont capables de gérer leur allergie doivent pouvoir connaître l'origine des protéines présentes au sein de leurs aliments (Wal, 2001).

En bref, la méfiance face aux OGM est de mise, et le principe de précaution doit s'appliquer. Ce principe, que l'on peut également qualifier de principe « d'extrême prudence », est en fait un mécanisme de gestion des risques dans un univers scientifique incertain. Tant qu'il n'a pas été prouvé qu'un produit est sans aucun danger, toutes les mesures doivent être prises afin d'éviter ce danger. C'est pourquoi l'ensemble des effets éventuels à long terme sur la santé du consommateur devront être tenus à l'œil. Ceci nécessite donc une bonne traçabilité des produits consommés (Bertheaux *et al.*, 1999).

### **I.4. L'étiquetage : une nécessité** (Figure I.2)

En 1990, la dissémination des OGM dans l'environnement a été régulée par la directive européenne CE 90/220. Cette directive prévoit une évaluation des risques pour l'environnement et pour la santé humaine. Au total, ont été autorisés trois maïs (Mon 810, T25 et Bt 176) pour toute utilisation (importation, culture et transformation industrielle), trois types de cultures (maïs Bt 11, Soja 403-2 et colza Topas 19/2) pour importation et

transformation et enfin trois chicorées (RM3-3, RM3-4 et RM3-6) pour cultures (Figure I.3).

Sept ans plus tard, l'Europe revoit sa copie et va plus loin avec le règlement CE 258/97 relatif aux nouveaux aliments et ingrédients alimentaires. Selon ce règlement, avant d'être mis sur le marché, ces produits nouveaux doivent répondre à une évaluation concernant la sécurité alimentaire ; en outre des dispositions particulières d'étiquetage sont prises. En ce qui concerne les produits nouveaux dérivés d'OGM, des dispositions générales d'étiquetage ainsi que des mentions supplémentaires sont imposées à titre informatif pour le consommateur. Selon ces dispositions, l'étiquetage doit être proportionnel en vue d'assurer l'information du consommateur ; en l'occurrence, il doit être utile, nécessaire, et ne doit pas induire de charges excessives à l'entreprise. Il ne doit pas créer d'exigence surdimensionnée par rapport au besoin d'informations pour le consommateur et ne doit en aucun cas induire ce dernier en erreur. Tout ceci ne concerne pas les additifs ou les arômes bien qu'un projet de règlement est prévu à cet effet.

Dès 1998, un autre règlement (règlement CE 1139/98) lève les imprécisions du précédent et s'applique depuis le 1<sup>er</sup> septembre de cette année-là. Les critères à prendre en compte pour l'étiquetage y sont précisés concrètement. De manière pratique, la mention "contient des OGM" doit être mentionnée dans la liste des ingrédients et ce de manière lisible mais sans encore établir de seuil.

Le règlement 49/2000 (CE) de la Commission du 10 janvier 2000 modifiant le règlement 1139/98 rend cet étiquetage obligatoire à partir du moment où 1% de chaque ingrédient considéré individuellement est génétiquement modifié. En deçà de ce seuil, les produits seraient dispensés de cette obligation.

Il faut noter que la directive 2001/18/CE du Parlement européen et du Conseil du 12 mars 2001 abroge la directive 90/220/CE et, tout en reprenant les principes, accentue le recours au principe de précaution en stipulant que les Etats doivent tout mettre en œuvre pour éviter que des conséquences dommageables soient portées au consommateur ou à l'environnement.

Le fait de vouloir construire une réglementation à propos de l'étiquetage de ces produits implique nécessairement l'élaboration de méthodes de détection, d'identification et de quantification officielles. Ces techniques se devront d'être fiables, reproductibles et appliquées à l'échelle internationale (Bertheaux *et al.*, 1999).

### **I.5. Méthodes de détection des OGM** (Figure I.4)

A l'heure actuelle, les différentes méthodes utilisées pour détecter les OGM reposent soit sur la recherche de protéines caractéristiques de ces organismes soit sur des séquences ADN cibles spécifiques également.

Les techniques de détection des protéines sont basées sur l'utilisation d'outils immunologiques tels que les anticorps. Celles-ci présentent les avantages d'être réalisées facilement et à moindre coût. Cependant, il subsiste plusieurs inconvénients. Tout d'abord, elles ne permettent pas d'établir clairement l'identification de l'OGM car une même protéine peut être présente dans plusieurs plantes modifiées et la quantification reste impossible. De plus, lors de la transformation des aliments, les protéines sont généralement dégradées, ces méthodes de détection nécessitent donc des produits frais et non transformés (Wolfram, 1997).

Quant aux techniques basées sur l'ADN, elles utilisent l'amplification de séquences spécifiques via différentes techniques telles que la PCR. Les séquences choisies sont celles qui sont les plus spécifiques de l'OGM étudié comme les fragments de bordure, les jonctions entre le génome de la plante et le transgène (Bertheaux *et al.*, 1999). L'ADN étant beaucoup plus résistant que les protéines aux processings alimentaires, ces techniques vont pouvoir être appliquées sur des aliments transformés. Malheureusement, le prix de ces méthodes constitue pour la plupart un inconvénient majeur.

Parmi les techniques les plus utilisées, il y a la PCR screening et la real-time PCR.

La PCR screening est une PCR qualitative. En fait, elle permet de détecter des fragments spécifiques des OGM tels que des promoteurs (CaMV 35-S promoter), terminateurs (Nos-Terminator) ou encore des gènes de sélection couramment utilisés dans la fabrication des OGM. L'inconvénient de ce procédé est qu'il ne permet pas d'identifier un OGM. De plus, il y a un risque de faux-positifs puisque la plante pourrait être contaminée par CaMV (Cauliflower Mosaic Virus) ou *Agrobacterium* et ce, de manière tout à fait naturelle ce qui donnerait lieu à un résultat positif erroné (Ahmed, 2002).

Quant à la Real-time PCR (voir point II.2.), elle présente de nombreux avantages dont la quantification et la haute sensibilité (Ahmed, 2002). Ces caractéristiques sont deux aspects cruciaux pour l'étiquetage des OGM. En fait, par cette technique, la cinétique de la réaction peut être suivie cycle par cycle et permettre ainsi la détermination de la concentration en ADN. D'un point de vue pratique, pour la détermination du produit PCR,



on recourt à l'utilisation, par exemple, des sondes Taq Man. Ces sondes Taq Man génèrent de la fluorescence une fois que la sonde est hybridée à sa séquence cible ; ceci permet ainsi une détection directe tout au long de la réaction de la PCR (Schweiger *et al.*, 2000). Cependant, il faut signaler que les graisses, huiles et condiments sont difficilement détectés via cette technique et que son coût est assez élevé (Ahmed, 2002).

## **II. LES TECHNIQUES D'AMPLIFICATIONS**

## **II.1. La PCR (Polymerase Chain Reaction)**

La PCR est un processus cyclique d'amplification de l'ADN qui permet de détecter la présence d'acides nucléiques même en quantité très réduite dans un échantillon. Première technique d'amplification de l'ADN, développée en 1986, elle est relativement simple au niveau de son concept (Richards, 1991). Elle est la plus connue et la plus répandue à travers le monde scientifique (Mullis *et al.*, 1987) (Figure I.5).

Chaque cycle s'effectue en trois étapes ayant lieu à des températures déterminées.

La première étape s'effectue à une température d'environ 94°C et permet la dénaturation de l'ADN double brin en deux simples brins.

Ensuite, la seconde étape consiste en la reconnaissance et l'hybridation de deux petits oligonucléotides complémentaires de la séquence cible d'ADN simple brin. Ces deux oligonucléotides constituent des séquences synthétiques spécifiques de la cible. La température associée dite d'hybridation ou d'annealing varie de 45°C à 65°C en fonction de la composition des oligonucléotides et de leur longueur.

Pour finir, la partie double brin formé entre l'ADN cible et les amorces est reconnue par une enzyme : la Taq polymérase. Cette enzyme permet l'élongation en copiant le brin maternel. La température à laquelle s'effectue cette étape est de 72°C, température optimale d'activité pour la Taq polymérase. Cette dernière est thermostable ce qui lui permet de résister lors de l'étape de dénaturation même si elle perd de son activité au fil des divers cycles de chauffage.

En règle générale, les cycles sont répétés entre 25 et 40 fois et permettent d'amplifier jusqu'à un million de fois une séquence d'ADN cible. En fait, après chaque cycle, non seulement les brins d'ADN originaux mais aussi les amplicons (brins nouvellement synthétisés) constituent des matrices pour la Taq polymérase dans les cycles suivants. Suite à chaque cycle, la quantité d'ADN présente dans l'échantillon double ; l'amplification est donc exponentielle. Les 40 cycles ne sont généralement pas dépassés. En effet, une fois dépassé ce nombre de cycles, il y a épuisement des réactifs nécessaires à la PCR et les amplicons risquent de se réhybrider entre eux en raison de leur grand nombre.

Cette technique semble être idéale et pourtant elle comporte des points faibles. En effet, elle est sujette au risque de contamination par de l'ADN étranger provenant de l'air,

du matériel ou du manipulateur. L'origine principale de ces contaminants est une amplification précédente. Pour y remédier, des mesures drastiques doivent être prises comme par exemple des pièces spécialement équipées et uniquement dédiées à cet usage.

La PCR présente également un caractère aléatoire et une sensibilité importante ce qui n'est guère favorable à une reproductibilité de tube à tube. De plus, elle requiert une certaine adresse au niveau technique ainsi qu'un équipement spécial assez conséquent (Wolcott, 1992).

Quant à la Taq polymérase, cette enzyme ne possède pas d'activité exonucléase 3'-5' de correction ce qui peut être la cause de mutations au niveau de la séquence d'ADN amplifiée. D'autres polymérases sont disponibles sur le marché et disposent de cette activité. En fait, le choix de la polymérase est fonction du but de la PCR.

Sur base de la PCR, plusieurs variantes ont été développées. Quelques unes sont décrites ci – dessous.

La PCR quantitative permet une quantification d'ADN cible contenu au sein d'un échantillon. En fait, au cours de la PCR, le rendement d'amplification varie d'un échantillon à l'autre et s'amenuise au fur et à mesure des cycles. La détermination de la quantité d'ADN est alors plus que périlleuse. En appliquant cette variante, une estimation est possible. En fait, une PCR est réalisée en parallèle à celle de l'ADN cible ; elle s'effectue sur un nombre connu de copies d'un autre ADN dit standard. Ce dernier peut soit être interne ou externe selon que les PCR soient réalisées ou non dans un même tube. Il est bien évident que pour pouvoir être comparées ces deux amplifications doivent être réalisées dans des conditions identiques : même nombre de cycles, mêmes amorces de préférence et des amplicons de tailles similaires étant les plus homologues possibles (Gilliland *et al.*, 1990 ; Hübner *et al.*, 1999b).

La real-time PCR est une version avancée de la PCR quantitative. En fait, une lecture en fluorescence est réalisée avant que le rendement ne s'amenuise, c'est-à-dire lors de la phase exponentielle de l'amplification. A ce moment, la concentration en ADN est proportionnelle au nombre de cycles. Une droite d'étalonnage du nombre de cycles en fonction de la quantité d'ADN est ainsi établie. En plus de la possibilité de quantification, ce procédé permet la détection même d'un faible nombre de copies d'ADN grâce à sa sensibilité (Ahmed, 2002 ; Salmon, 2002).

La PCR multiplex est une amplification de plusieurs séquences ADN différentes via l'utilisation de plusieurs paires d'amorces différentes. Cette technique permet donc l'amplification de différentes cibles lors d'une seule expérience. Sa mise au point est

cependant relativement complexe vu le nombre d'amorces utilisées qui risquent de former des dimères et qui peuvent être à l'origine d'amplifications potentielles non spécifiques spécialement sur de l'ADN génomique (Edwards *et al.*, 1994).

La nested PCR est basée sur la réalisation de deux PCR successives. En fait l'ADN amplifié lors de la première PCR sert de cible pour la deuxième qui utilise une nouvelle paire d'amorces. D'une part, elle est avantageuse lorsque la quantité d'ADN à détecter est très faible et d'autre part l'utilisation successive de deux couples d'amorces permet d'augmenter la spécificité du test. L'inconvénient est la probabilité plus importante de contaminations dues à l'ouverture des tubes entre les deux PCR pour y placer le second couple d'amorces (Newton *et al.*, 1994).

La RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) est une PCR dont le matériel de départ est de l'ARN messager. En fait, celui-ci est réécrit en ADN complémentaire grâce à une enzyme, la transcriptase inverse. Par cette technique, seul l'ARN messager est amplifié et pas l'ADN génomique. Ceci implique que le choix des amorces soit déterminant pour ne détecter que l'ARNm. Le choix le plus judicieux est de prendre des amorces à l'endroit où deux exons se juxtaposent alors que dans l'ADN génomique, ceux-ci sont séparés par un intron. Cette technique demande de nombreuses précautions lors de la manipulation en raison de la fragilité de l'ARN (Bustin, 2000 ; Newton *et al.*, 1994).

## **II.2. La LCR (Ligase Chain Reaction)**

Développée en 1989, la LCR est une autre technique d'amplification et de détection d'une séquence cible mise au point par la société Abbott (Hill, 1996 ; Wu *et al.*, 1989) (Figure I.6). Il s'agit également d'une réaction cyclique : dénaturation, hybridation et ligation sont la base de ce procédé d'amplification. Mais contrairement à la PCR au cours de laquelle il y a création d'une molécule d'ADN double brin à partir de nucléotides individuels, dans ce cas, deux oligonucléotides spécifiques de l'ADN cible sont joints.

La ligation est en fait permise grâce à une enzyme thermostable, la ligase. Cette enzyme a pour rôle de lier des oligonucléotides seulement si ceux-ci sont sérieusement hybridées au cible (Wolcott, 1992).

A la fin de chaque cycle, les brins nouvellement ligués peuvent à leur tour servir de matrice dans les cycles suivants (Wu *et al.*, 1989). C'est ainsi que, après chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN cible se retrouve être doublée. Le nombre de cycles oscille entre 20 et 30 ; la séquence cible est alors amplifiée jusqu'à un million de fois (Wolcott, 1992).

De la même manière que la PCR, la LCR présente le désavantage d'être très sensible aux contaminations. Cela engendre donc la nécessité de prendre de nombreuses précautions lors de la manipulation.

Parallèlement, une autre variété de réaction de ligation existe ; celle-ci implique l'utilisation simultanée de la ligase et d'une polymérase thermostable. Cette LCR modifiée est appelée la Gap-LCR. En fait, elle se différencie de l'original par la position des deux amorces oligonucléotidiques. Ces derniers sont en fait hybridés au cible tout en laissant un espace que la polymérase se chargera de venir combler. Pour terminer, la ligase n'aura plus qu'à connecter la séquence nouvellement synthétisée à la seconde amorce (Abravaya *et al.*, 1995).

### **II.3. La TAS (transcription-based amplification system)**

Mise au point par Kwoh *et al.* en 1989, cette technique d'amplification est un processus basé sur la synthèse d'ADN dans un premier temps et puis sur la transcription de cet ADN en ARN dans un second.

Au cours de ce processus, il y a tout d'abord hybridation de l'ARN à une amorce qui comprend un site de liaison à la polymérase. Un fois que l'hybridation a eu lieu, une transcriptase inverse allonge l'amorce dans le but de constituer de l'ADN complémentaire (ADNc). Après dénaturation à une température élevée, une autre amorce vient s'hybrider à ce brin d'ADNc. Grâce à l'action de la transcriptase inverse, un ADNc double brin est obtenu. Vient alors dans un second temps, par addition d'ARN polymérase, une production d'un grand nombre de copies d'ARN. Via cette méthode, le million de copies peut être atteint après seulement quatre cycles (Wolcott, 1992) (Figure I.7).

De cette technique dérive la 3SR (Self Sustained Sequence Replication). Ce qui différencie la 3SR de la TAS est tout d'abord son caractère isothermique (37°C à 42°C) et deuxièmement la dégradation de l'ARN cible. Cette technique peut également être utilisée

dans le but d'amplifier de l'ADN si une étape de dénaturation a lieu au préalable. La RNase H est utilisée pour dégrader le brin d'ARN de l'hybride ADN/ARN formé au début de la réaction. L'hybridation d'une amorce et l'action d'une ADN polymérase vont permettre la formation d'ADN double brin qui, par la suite serviront de matrice pour synthétiser des multiples copies d'ARN. Environ cent milles copies sont obtenues après seulement 15 minutes de réaction alors que 85 minutes seraient nécessaires à une PCR pour obtenir pareils résultats. Les avantages vis-à-vis de la PCR se situe dans la fait qu'elle se déroule à une température constante et nécessite un nombre réduit de cycles. Par contre, aucune solution n'est apportée par la 3SR aux problèmes de contaminations par des acides nucléiques étrangers. D'autres désavantages sont aussi à signaler : spécificité moindre, nécessité d'une importante quantité d'enzymes et dégradation plus rapide de l'ARN (Wolcott, 1992) (Figure I.8).

La NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) est une autre méthode isothermique développée à partir de la TAS et très proche de la 3SR (Wolcott, 1992). Cette technique est principalement utilisée pour l'amplification de molécules ARN (Carrino *et al.*, 1995). Pour que l'amplification ait lieu, une action concertée entre une *Avian Myeloblastosis Virus* (AMV) reverse transcriptase, une T7 RNA polymérase et une RNase H est nécessaire. Quant à ses avantages, elle ne nécessite pas de cycles de température et aucune étape de reverse transcriptase séparée n'est requise (Uyttendaele *et al.*, 1995 a et b) (Figure I.9).

#### **II.4. La Q $\beta$ replicase**

Exposée pour la première fois en 1965 par Haruna et Spiegelman, il s'agit d'une autre possibilité pour amplifier des acides nucléiques. L'origine du nom de cette technique provient de l'enzyme responsable de l'amplification, la réplicase du bactériophage Q $\beta$ . Cette enzyme est constituée de quatre sous-unités dont une provient du bactériophage Q $\beta$  et les trois autres de l'hôte qu'est *Escherichia Coli* (Cahill *et al.*, 1991 ; Lizardi *et al.*, 1991). Au sein du bactériophage, la réplicase a pour rôle de recopier le génome ARN lors de l'infection par celui-ci. In vitro, elle est capable de répliquer des petits ARN (Figure I.10).

La molécule d'ARN nommé le midivariant (MDV-1) est l'une des cibles spécifiques de la Q $\beta$  réplicase. En fait, l'insertion d'une séquence d'acides nucléiques

dans un loop complémentaire de MDV-1 est possible sans que cela ne vienne gêner la réplication par la suite. Ce MDV-1 modifié peut alors être hybridé et ensuite l'enzyme va venir amplifier le nombre de ces MDV-1 (Wolcott, 1992).

Cette amplification de l'ARN via la Q $\beta$  replicase permet d'obtenir un signal de détection plus intense. Ce n'est donc pas un procédé qui augmente la quantité d'acides nucléiques cibles comme l'est la PCR. En moins de 15 minutes, le nombre de copies d'ARN est d'environ  $10^6$  à  $10^9$ . La quantification est possible en raison de la cinétique de la réaction qui permet de construire une courbe standard et de déterminer la concentration initiale de complexes liés (Wolcott, 1992).

En ce qui concerne les contaminations, elles sont réduites grâce à l'utilisation de sondes poly A d'une part et de billes magnétiques poly dT d'autre part. Ces deux derniers sont ainsi liés. Quant au matériel contaminant résiduel, il peut être nettoyé par lavages (Cahill *et al.*, 1991).

## **II.5. La CPT (Cycling Probe Technology)**

### **II.5.1. Principe**

La CPT aussi appelée CPR (Cycling Probe Reaction) est une méthode d'amplification cyclique et isothermique permettant la détection de séquences d'ADN spécifiques. Mise au point par ID Biomedical, son principe est relativement simple. Elle est basée sur l'utilisation d'une sonde chimérique c'est-à-dire d'une sonde simple brin constituée d'ADN-ARN-ADN. Cette sonde est spécifique de la séquence ADN à détecter et placée en excès, elle vient s'hybrider sur la séquence cible. Il s'agit d'une hybridation en solution qui sera décrite plus loin au point III.5.2. Une enzyme thermostable, la RNase H, reconnaît spécifiquement les hybrides ADN-ARN et vient cliver les bases d'ARN créant alors deux oligonucléotides à partir de la sonde de départ. Ces fragments de sonde vont alors se détacher du cible. Ce dernier est ainsi libre de s'hybrider avec une autre sonde chimérique intacte. Il en résulte une accumulation de ces sondes clivées. La CPT va donc amplifier le signal de détection au lieu d'amplifier directement la séquence cible à détecter (Figure I.11).

Les deux oligonucléotides obtenus suite au clivage par la RNase H se détachent spontanément du cible en raison de leur petite taille. En fait, la température de melting

( $T_m$ ) qui représente la température à laquelle il y a cinquante pour cent de désappariement de l'oligonucléotide est directement proportionnelle à sa longueur. Or la température à laquelle s'effectue la réaction de la CPT est inférieure à la température de melting de la sonde chimérique non clivée mais supérieure à celle des deux fragments obtenus après action de l'enzyme. C'est pourquoi, il y a instabilité et détachement des oligonucléotides clivés.

La CPT présente de nombreux avantages. Tout d'abord, il s'agit d'une technique simple et rapide, n'utilisant qu'une sonde et une enzyme et se déroulant à température constante (réaction isothermique) (Modrusan *et al.*, 1998). Elle ne nécessite donc pas de matériel coûteux et d'infrastructures importantes (Warnon *et al.*, 2000). Ensuite, la séquence cible n'est pas amplifiée, ce qui minimise le risque de contaminations et évite ainsi de devoir prendre des précautions fastidieuses (Beggs *et al.*, 1996). De plus, elle est également reproductible et fiable. Une quantification est également possible vu la linéarité de la technique ; en effet, il n'y a qu'une seule coupure de la sonde par cycle. Enfin, elle est flexible quant au nombre et à la variété des méthodes de détections : de nombreuses possibilités existent (Duck *et al.*, 1990).

La principale limite de la CPT est son manque de sensibilité comparé à la PCR. En effet, la PCR permet une amplification d'un million de fois alors que la CPT est limitée à seulement mille fois. Divers développements sont possibles dans le but d'améliorer la sensibilité mais aussi pour éliminer tout risque de clivages non spécifiques. En fait, un des points clef dans la mise au point de la réaction est le choix de la sonde chimérique. Il est primordial que les structures secondaires stables soient évitées, d'autant plus si ces dernières comprennent les bases ARN. En effet, si un pareil repliement a lieu, la RNase H risque de venir cliver les bases ARN sans que le cible ne soit présent.

La CPT semble également ouvrir de nouveaux horizons dans les recherches de diagnostics de modifications génétiques, de détection d'ADN étranger ou bien encore de mutations ponctuelles.

### **II.5.2. La ribonucléase H**

La ribonucléase H dite aussi RNase H est une enzyme et plus précisément une endonucléase. Elle clive spécifiquement l'ARN des hybrides ADN/ARN. En fait, elle



hydrolyse un lien phosphodiester de l'ARN ce qui donne lieu à une extrémité 3' hydroxyle et une autre 5' phosphate (Figure I.12.A). En aucun cas, elle ne clive les simples brins d'ADN ou d'ARN. Elle constitue un outil essentiel pour les manipulations génétiques et, dans le cadre de ce mémoire, pour la réalisation de la CPT.

Quant à ses origines, elles sont relativement diverses. L'enzyme a été découverte à la fois dans le thymus de veau ou dans de nombreux organismes tels les bactéries (Inoue *et al.*, 1987). Celle utilisée pour la CPT est une RNase H issue de *Thermus thermophilus* (eubactérie thermophile): elle est thermostable et atteint son activité optimale à une température de 65°C mais reste très fonctionnelle jusqu'à environ 80°C (Figure I.12.B).

Pour permettre la détection d'une faible quantité d'ADN cible, une importante concentration en enzyme est nécessaire. Des études ont été réalisées pour permettre une meilleure fixation de l'enzyme à la séquence et réduire ainsi la quantité d'enzymes nécessaire en améliorant son efficacité et sa spécificité (Bekkaoui *et al.*, 1996). Des modifications ont alors été apportées. Une RNase H thermostable modifiée a par exemple été construite par clonage et exprimée chez *Escherichia Coli*. En fait, il s'agit d'une fusion entre le gène de la RNase H et la streptavidine. Une protéine d'un poids moléculaire de 128 kDa et composée de quatre sous-unités est ainsi obtenue. Cette RNase H–streptavidine sera utilisée avec une sonde chimérique marquée à la biotine.

### **II.5.3. Méthodes de détection des produits de la CPT**

En théorie, l'idéal serait de pouvoir détecter une sonde unique qui s'hybride à son cible, or le signal n'est pas suffisamment important. En pratique, il est très difficile de détecter une seule réaction d'hybridation.

Les méthodes de détection des produits de la CPT peuvent être basées sur la radioactivité ou sur d'autres techniques dites « froides » (Duck *et al.*, 1990). Ces dernières sont bien évidemment préférées vu les contraintes de la radioactivité. Il est important que le marquage soit réalisé *via* une petite molécule de façon à ce qu'il n'y ait pas d'interférence avec l'appariement des bases lors de l'hybridation (Remacle *et al.*, 1994).

#### **a) La radioactivité**

Un marqueur radioactif, tel le phosphore  $^{32}\text{P}$ , offre une importante sensibilité au niveau de la détection. Ces isotopes sont généralement intégrés dans la structure et sont quantifiés.

La sonde utilisée lors de la CPT est marquée par un isotope radioactif,  $^{32}\text{P}$ . Le pourcentage de sonde clivée est évalué par la suite via électrophorèse sur un gel de polyacrylamide (Duck *et al.*, 1990). Ce gel est en fait un gel dénaturant qui permet la séparation d'oligonucléotides de longueurs différentes. Au sein du gel, les fragments d'ADN subissent un champ électrique qui provoque une migration de l'ADN négativement chargé vers la borne positive. La vitesse à laquelle s'effectue la migration est fonction de la taille du fragment d'ADN. C'est ainsi que la distinction entre la sonde clivée et celle non clivée est possible.

Bien que toujours utilisés à l'heure actuelle et très sensibles, ces isotopes présentent des inconvénients majeurs : temps court de demi-vie, manipulations non aisées, problèmes de sécurité et de déchets. C'est pourquoi les industriels se penchent davantage sur les techniques alternatives froides (Remacle *et al.*, 1994).

### b) La chémoluminescence et la luminescence

Elle repose sur l'emploi d'enzymes qui sont couplés à des protéines comme l'avidine ou à des anticorps. Ces conjugués peuvent reconnaître les sondes marquées respectivement à la biotine ou avec des haptènes telles les dioxygénines (Remacle *et al.*, 1994) (Figure I.13).

Les enzymes principalement utilisés sont la peroxydase, la phosphatase alcaline et la pyruvate kinase. Elles donneront alors lieu, par modification d'un substrat, à un produit émettant des photons ou de la fluorescence (Remacle *et al.*, 1994).

Faciles à mettre en œuvre, les réactions de chémoluminescence donnent des résultats très satisfaisants de détection de produits d'amplification. En effet, elles sont relativement sensibles et semi-quantitatives. De plus, des recherches et développements de substrats chémoluminescents s'effectuent dans le but d'obtenir des résultats plus précis et plus sensibles encore (Fini *et al.*, 1999).

Parmi les différentes possibilités, une sonde marquée à la fluorescéine peut par exemple être reconnue *via* un anticorps anti-fluorescéine conjugué à une phosphatase

alcaline ou une « horse radish peroxydase » (HRP). Si on ajoute un substrat chémoluminescent correspondant à cette enzyme, celui-ci va être dégradé et émettre de la lumière qui pourra être quantifiée. C'est un procédé sensible et non radioactif (Martin *et al.*, 1995).

Une variante est d'utiliser un conjugué streptavidine peroxidase lorsque la sonde est cette fois marquée par une biotine. En raison de la forte affinité existant entre la biotine et la streptavidine, une liaison solide va s'établir entre les deux. La détection s'effectue alors via la peroxidase (HRP) comme décrit ci-dessus (Alexandre *et al.*, 1998).

Un autre test couramment employé est basé sur l'utilisation d'une sonde marquée avec un ester d'acridium. La réaction est en fait initiée en ajoutant du peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  et de l'HRP. Une lumière est alors produite en raison de l'attaque portée sur l'ester par  $H_2O_2$ . La quantité de lumière est directement proportionnelle à la quantité de cible présent. Un luminomètre est requis pour la mesure (Wolcott, 1992). Cette réaction est complète en quelques secondes. Mais son principal désavantage est la très courte diffusion de la lumière ce qui rend la quantification relativement difficile (Remacle *et al.*, 1994).

En fait, toutes ces méthodes froides pourraient être adaptées à la détection des produits de la CPT.

### c) Le « strip assay »

Il s'agit d'une technique développée pour détecter particulièrement les produits CPT. La sonde chimérique utilisée est marquée avec une fluoréscéine en 5' et une biotine en 3' (Figure I.14).

Pratiquement, une fois la CPT terminée, le strip, une membrane de nitrocellulose composée de différentes parties, est placé dans le tube où la réaction s'est déroulée. L'échantillon est alors adsorbé sur la membrane constituant le strip et va circuler à travers cette membrane par flux latéral. La sonde chimérique va rencontrer et se lier à des anti-F-GP (anticorps anti-fluoréscéine couplé à une peroxydase). Le complexe formé par la sonde non clivée et les Anti-F-GP sera par la suite retenu au niveau de la ligne de streptavidine (ligne test) *via* la biotine. Les sondes non clivées indiquant l'absence du cible sont ainsi isolées. Une seconde ligne contrôle, cette fois constituée d'IgG, permettra de prouver que le flux du liquide s'est bien effectué normalement à travers le strip. Cette ligne résulte de la liaison d'un excès d'anticorps anti F-GP aux IgG anti-souris de lapin (Fong *et al.*, 2000).

### **III. L'hybridation**

#### **III. 1. Notions de base et principes**

La structure de l'ADN en double hélice fut mise en évidence en 1953 par Watson et Crick. Depuis, de nombreuses recherches ont été effectuées sur le sujet.

Un brin d'ADN est composé de la succession de 4 bases nucléotidiques : adénine, guanine, cytosine et thymine. La double hélice est formée grâce à l'association forte entre deux brins d'ADN *via* des liaisons hydrogènes. Ces liaisons non covalentes se forment entre les bases complémentaires : l'adénine s'associe à la thymine et la cytosine à la guanine. Ces liaisons appelées également « ponts hydrogènes » peuvent être brisées par la chaleur ou des pH extrêmes. On parle de dénaturation. Si les conditions reviennent à la normale, c'est-à-dire plus favorables, les simples brins, bien que relativement stables, peuvent à nouveau se réassocier en double brin. On parle d'hybridation lorsque les deux brins sont indépendants (d'origine différente) mais complémentaires. La stabilité de l'hybridation est directement fonction de la complémentarité existant entre les deux brins.

Une correspondance parfaite entre les séquences nucléotidiques conduit à un double brin très stable tandis qu'un ou plusieurs mésappariements déstabilisent le double brin (Wolcott, 1992).

### **III.2. Les sondes nucléiques**

La sonde va s'hybrider à la séquence cible qui lui est spécifique. Plus l'homologie entre la sonde et la cible est importante, plus l'hybridation sera stable. A signaler, les sondes ADN et ARN se comportent en général de la même façon.

La taille de la sonde est variable : de 10 bases nucléotiques à 10.000 ou plus encore mais le nombre de bases nucléotidiques constituant les sondes est généralement compris entre 14 et 40 et assez couramment aux alentours de 20 bases. La taille de la sonde a toutefois des répercussions sur la spécificité de l'hybridation, la sensibilité, la stabilité et donc sur les conditions et la vitesse de réaction (Wolcott, 1992). Une sonde de petite taille aura tendance à s'hybrider plus vite qu'une grande mais le risque d'hybridation non spécifique est plus important. En effet, plus une sonde est petite, moins elle est stable et donc, moins les conditions d'hybridation peuvent être stringentes. De plus, ces petites sondes sont moins spécifiques et difficiles à marquer. Quant aux sondes de plus longues tailles, elles sont plus stables et plus spécifiques que les petites dans des conditions de

haute température et de concentration en sels faibles (Wolcott, 1992). Dans le but d'assurer une spécificité optimale, la séquence cible se doit d'être non seulement parfaitement connue, mais également unique (Wolcott, 1992).

Plusieurs procédés existent pour créer ces sondes. Lorsqu'il s'agit de sondes dont la taille est inférieure à 100 bases, la synthèse chimique est la plus adéquate : les prix proposés par les nombreuses sociétés sont très abordables. Au-delà, il est préférable de se tourner vers la technique de la PCR, dans ce cas deux brins complémentaires sont obtenus et risquent de se réassocier (Remacle *et al.*, 1994).

Les sondes doivent également présenter la caractéristique d'être détectables suite à l'hybridation. Plusieurs possibilités sont offertes et sont dépendantes de la méthode de marquage utilisée.

Ce marquage doit être réalisé *via* des molécules de petites tailles, et cela dans le but d'éviter toute interférence avec l'appariement des bases lors de l'hybridation. Généralement, il s'agit de fluoréscéine ou de fluorochrome ou de biotine, ... (Remacle *et al.*, 1994).

Le marqueur peut être soit attaché, soit incorporé à la sonde pendant sa synthèse. Celui-ci sera détectable de manière directe ou indirecte. Dans le second cas, la reconnaissance se fait lors d'une étape ultérieure.

Quant au cible, comme déjà souligné plus haut, il sera parfaitement connu et unique : son choix est donc déterminant. Les cibles sont généralement de l'ADN vu qu'ils contiennent des régions uniques. Toutefois, les cibles ARN sont aussi utilisés car le nombre de copies d'ARN est plus important dans une cellule par rapport à l'ADN mais le travail avec l'ARN nécessite des précautions particulières en raison de l'action de la RNase A (Wolcott, 1992).

### **III.3. Les facteurs influençant l'hybridation**

L'hybridation moléculaire se déroule en deux étapes successives (Figure I.15 et I.16).

Tout d'abord, il y a la nucléation. Il s'agit d'une étape s'effectuant par essai-erreur, où des doubles brins se constituent. En raison de la formation de ponts hydrogène et des

ruptures, cette étape nécessite un apport d'énergie. C'est pourquoi la solution d'hybridation est généralement chauffée.

La seconde étape est celle de propagation au cours de laquelle les ponts hydrogène se forment rapidement et successivement (réaction de *zippering* ou de fermeture éclair). Dans cette deuxième étape, il y a cette fois libération de l'énergie. La vitesse à laquelle la réaction s'effectue peut être influencée par différents paramètres que nous allons passer en revue dans ce chapitre.

### **III.3.1. La température**

Lorsque la température est basse, la vitesse de réaction est pratiquement nulle, ou très faible. En fait, la nucléation nécessite un apport d'énergie que pourrait lui offrir une température plus élevée. La vitesse va donc augmenter de manière quasi exponentielle par rapport à la température. Toutefois, aux trop hautes températures, il y a des risques de cassure des liaisons formées entre les brins (Figure I.17). La température optimale d'hybridation qui correspondrait à la vitesse maximale de la réaction est déterminée par la température de melting ( $T_m$ ) des hybrides. Cette température correspond à celle où 50% des bases nucléotidiques sont associées et 50% ne le sont pas, la double hélice est donc à moitié dénaturée (Figure I.18).

Généralement, la température d'hybridation la plus utilisée est inférieure de 15°C à 25°C par rapport au  $T_m$  de la sonde (Remacle *et al.*, 1994).

Le choix de la température est primordial, surtout lorsqu'il s'agit de différencier des séquences très homologues. Pour ce faire, une  $T_m - 10^\circ\text{C}$  sera choisie pour sélectionner uniquement la séquence désirée et non les séquences proches (Figure I.19). La sélectivité de l'hybridation permet alors la discrimination nécessaire à la mise en évidence de mutations ponctuelles par exemple.

### **III.3.2. La force ionique**

Plus la concentration en sels augmente, plus la vitesse d'hybridation sera importante. Généralement, il s'agit de NaCl dont la présence des ions sodium  $\text{Na}^+$  neutralisent les charges négatives des phosphates compris dans la molécule d'ADN. Les

deux brins ainsi neutralisés ne se repoussent plus. Il y a alors un effet favorable pour la réassociation (Wetmur *et al.*, 1968).

### **III.3.3. La composition de la chaîne**

La composition de la chaîne et le pourcentage de G-C ont peu ou pas d'influence sur la vitesse de l'hybridation. La composition influence principalement la stabilité du double brin formé (Remacle *et al.*, 1994). Plus la sonde sera riche en G-C, plus sa température de melting sera élevée.

### **III.3.4. La taille de la sonde**

La vitesse de réassociation des brins serait directement proportionnelle à la racine carrée de la longueur des chaînes. Plus c'est long, plus il y a de probabilités de nucléation mais plus il y a d'encombrements également.

La relation est valable pour des tailles allant de  $10^2$  à  $10^5$  paires de bases. Si une des deux sondes est plus courte, cette dernière limite la vitesse (Remacle *et al.*, 1994).

### **III.3.5. La viscosité**

Une viscosité accrue par l'utilisation d'agents comme le glycérol et le sucre conduit à une diminution de la vitesse de réassociation. Par contre, des molécules de haut poids moléculaire, tel le dextran sulfate et le ficoll augmentant la viscosité macroscopique conduisent à une augmentation de la vitesse ; ceci en raison de l'exclusion des molécules d'eau (Remacle *et al.*, 1994).

### **III.3.6. La formamide**

La formamide, agent organique dénaturant, diminue la température nécessaire à l'hybridation. En fait, elle déstabilise les doubles hélices et permet ainsi une association à des températures plus basses.



Pour l'ADN, une augmentation de 1% en formamide diminue la  $T_m$  de l'hybride d'approximativement 0,72°C (Remacle *et al.*, 1994).

Pour les hybrides ARN/ADN, il n'y a pas de relation linéaire entre la  $T_m$  et la concentration en formamide. L'effet de cette dernière sur ces hybrides est moindre que sur les hybrides ADN/ADN. En effet, en présence de 50% de formamide, la stabilité des hybrides ARN/ADN est supérieure à celle des complexes ADN/ADN (Remacle *et al.*, 1994).

### **III.3.7. La présence de mésappariements**

Les mésappariements c'est-à-dire les bases non complémentaires entre les deux brins influencent la  $T_m$ . Il est estimé que 1% de mésappariements diminuent la  $T_m$  de 1°C pour des grands brins d'ADN et de 5°C pour des petits oligonucléotides. Il s'agit d'une caractéristique intéressante pour distinguer deux sondes de 20 nucléotides différentes uniquement par une ou deux bases. Il est cependant nécessaire que cette (ces) bases distincte(s) ne soi(en)t pas située à l'extrémité. Une température la plus proche possible de la  $T_m$  de la sonde spécifique est recommandée pour différencier deux sondes très proches (Remacle *et al.*, 1994).

## **III.4. Les facteurs influençant la stabilité des hybrides**

La stabilité des hybrides dépend principalement du nombre de ponts hydrogène formés. Elle est déterminée *via* la  $T_m$  ou température de melting de la double hélice. Pour rappel, cette température correspond à celle où 50% des hybrides sont formés et 50% ne le sont pas. Cette température peut être influencée par différents paramètres :

### **III.4.1. La concentration en sels**

La concentration en sels est un facteur primordial, très influent sur la  $T_m$  et donc la stabilité (Wetmur, 1991). Pour de faibles concentrations en sels (0,01M-0,1M), une modification d'un facteur 10 entraîne un changement de  $T_m$  d'environ 16°C.

### III.4.2. La composition

Les hybrides riches en C et G sont plus stables en raison des trois liaisons hydrogènes qui les relient par rapport aux A et T (reliés par seulement deux liaisons). La  $T_m$  pour de pareils hybrides sera donc plus élevée.

### III.4.3. La longueur de la chaîne (du duplex) (D)

La longueur de la chaîne intervient de la manière suivante :  $500/D$  où D est la longueur du duplex. Ce rapport intervient dans la détermination de  $T_m$  en se soustrayant à la valeur du  $T_m$  comme décrit au point III.4.5. Et donc, au plus la longueur des chaînes est importante, au plus la  $T_m$  sera élevée, et donc la stabilité sera meilleure (Wetmur, 1991).

### III.4.4. Les mésappariements (P)

En présence de mésappariements, la  $T_m$  diminue de manière différente pour des grands ou des petits oligonucléotides (Wetmur, 1991). P est exprimé sous forme du rapport du nombre de mésappariements sur la longueur de l'oligonucléotide considéré.

### III.4.5. En bref

La  $T_m$ , qui détermine la stabilité d'un hybride ADN/ADN, est établie comme suit :

$$T_m = 81,5 + 16,6 \cdot \log_{10} ([Na^+]/1 + 0,7[Na^+]) + 0,41 (\%G+C) - 500/D - P$$

Où :

% G + C = le pourcentage des bases G et C dans l'ADN par rapport au nombre de bases totales.

D = longueur du duplex.

P = rapport de mésappariements.

Pour ce qui est des hybrides ARN/ADN (Wetmur, 1991) :

$$T_m = 78 + 16,6 \cdot \log_{10} ([Na^+]/1 + 0,7[Na^+]) + 0,7 (\%G+C) - 500/D - P$$

Quant aux hybrides ADN/ARN (Wetmur, 1991) :

$$T_m = 67 + 16,6 \cdot \log_{10} ([Na^+]/1 + 0,7[Na^+]) + 0,8 (\%G+C) - 500/D - P$$

Lorsqu'il s'agit de petits oligonucléotides :

$$T_m = 4 (G + C) + 2 (A + T)$$

Où :

$T_m$  est exprimé en degré Celsius.

G, C, A, T sont le nombre de bases constituant l'oligonucléotide.

La température d'hybridation optimale dans ce dernier cas est située 5 à 15° C sous la  $T_m$ .

### **III.5. Stratégies d'hybridation**

#### **III.5.1. Hybridation en solution**

Le principal avantage de l'hybridation en solution est la vitesse de réaction. En effet, celle-ci est jusqu'à cinq à dix fois plus élevée que sur support solide (Remacle *et al.*, 1994). Des molécules, dites accélératrices, peuvent être ajoutées pour améliorer le taux d'hybridation et retirées par la suite pour éviter des interférences au niveau du bruit de fond (Wolcott, 1992).

Bien qu'intéressant au niveau de la vitesse, l'hybridation en solution présente des inconvénients. Le protocole nécessite une étape supplémentaire de séparation de l'hybride du reste de la solution, avant la détection finale. Pour ce faire, les hybrides doivent être captés. Plusieurs méthodes sont possibles (Remacle *et al.*, 1994) : tout d'abord, une sonde biotinylée peut être captée sur une plaque coatée à la streptavidine ou à l'avidine. Egalement, lorsqu'elle est terminée par une queue poly A, la capture peut se réaliser sur des billes magnétiques coatées avec des poly T (Remacle *et al.*, 1994).

Une autre possibilité est l'utilisation d'hydroxyapatite. Cette molécule se lie uniquement à de l'ADN double brin. Un simple brin doit donc être nécessairement hybridé avec une sonde ou son complémentaire s'il veut que l'hydroxyapatite s'y lie. La séparation du mix de l'hybridation s'effectue en pratique sur une colonne où l'hydroxyapatite se fixe fortement. Seuls les doubles brins vont se lier par l'intermédiaire de l'hydroxyapatite

tandis que les simples brins passeront à travers la colonne. Celle-ci sera ensuite éluée et seuls les brins hybridés seront recueillis. Lors de la détection par activation du marqueur, seul le signal des hybrides sera pris en compte et les signaux parasites sont ainsi évités (Wolcott, 1992).

Une alternative supplémentaire est le méthidium, un acide nucléique intercalant, couplé à une bille de sépharose. Il lie l'ADN alors que les « contaminants » sont évacués. Ensuite, il ne reste plus qu'à récupérer l'ADN (Wolcott, 1992).

Lorsque l'hybridation est homogène, une technique basée sur une sonde marquée au phénol ester d'un acridium ester chemiluminescent peut être utilisée. Si la sonde est hybridée à son cible ADN, le phénol ester est protégé de l'hydrolyse. Si elle ne l'est pas, le phénol ester risque l'hydrolyse dont les conséquences seraient une perte de chemiluminescence. Ce procédé permet l'utilisation d'une grande concentration de sonde tout en évitant les problèmes de bruit de fond (Wolcott, 1992).

### **III.5.2. Hybridation sur support solide**

#### **a) Sur filtre**

L'hybridation sur filtre constitue le moyen le plus courant d'hybridation en dot-blot. Bien qu'il s'agisse du procédé le plus ancien et le plus utilisé dans les laboratoires de recherche, il est sujet à des problèmes d'interférences non spécifiques au niveau du bruit de fond (Wolcott, 1992) (Figure I.20).

L'ADN cible extrait et dénaturé est absorbé de manière covalente ou non sur un filtre, anciennement en nitrocellulose, et par la suite en nylon. Ces filtres peuvent être de qualité très diverse et parfois adaptés au type de marquage et de révélation en luminescence.

Ensuite, une sonde ADN marquée va pouvoir venir s'hybrider à sa cible fixée sur le filtre. Le marquage est réalisé *via* un réactif spécifique qui donnera ultérieurement un signal dont l'importance révélera le niveau d'hybridation. Il peut s'agir par exemple d'un conjugué enzyme / anticorps reconnaissant l'haptène fixé sur la sonde (Remacle *et al.*, 1994).

Comme dit plus haut, des problèmes de bruit de fond dus à une hybridation non spécifique de la sonde marquée se posent. Il est possible d'atténuer ce bruit de fond par la

technique de l'hybridation *sandwich*. Trois éléments interviennent : une sonde ADN capteur fixée sur support solide (trappeur), le cible et une sonde marquée qui générera un signal.

Le principe est simple : le cible sert de lien entre la sonde immobilisée sur le support et la sonde marquée. Si le cible est absent, aucun signal ne pourra être détecté étant donné que la sonde marquée ne pourra s'hybrider. En raison de la double spécificité, d'une part entre le capteur et le cible et entre le cible et la sonde d'autre part, nécessaire pour obtenir un signal, les interférences venant d'hybridation parasites sont minimisées (Wolcott, 1992 ; Alexandre *et al.*, 199).

Une variante à ce système est le « Strand displacement assay ». La sonde immobilisée sur le support est hybridée faiblement à une petite sonde marquée. En présence du cible, celui-ci rentre en compétition avec cette petite sonde qu'elle déplace et le cible vient s'hybrider au capteur. Plus le nombre de cible est important, plus le signal va diminuer. Ce procédé présente cependant des inconvénients : il est à la source de faux-négatifs et de faux-positifs. Les faux-négatifs sont dus au fait que la petite sonde n'est pas toujours déplacé et donc, cela empêche l'hybridation du cible sur le capteur. A l'inverse, dans certains cas, les petites sondes sont trop détachables du capteur, à l'origine de faux-positifs, ou de bruit de fond élevé (Wolcott, 1992) (Figure I.21).

### b) Sur plaque de polystyrène

Pour immobiliser l'ADN sur plaque de polystyrène, différentes possibilités existent : par adsorption passive, par exposition aux U.V., par liaison covalente de molécules d'ADN modifiées ou bien encore par liaison covalente à des poly (lys-HBr, Phe) adsorbés sur des plaques micropuits (Rasmussen *et al.*, 1991).

Un lien covalent entre la molécule d'ADN et le support solide et ce, en un seul point de l'ADN reste l'immobilisation idéale (Rasmussen *et al.*, 1991).

Des variations sont possibles : la molécule d'ADN peut être liée de manière covalente *via* soit l'extrémité 5', ou 3' aux poly (Lys-HBr, Phe) mais ces derniers ne seront qu'adsorbés et non liés de manière covalente au polystyrène.

Une liaison covalente directe entre l'ADN et le support permettent d'éviter les pertes du matériel lorsque les conditions stringentes sont utilisées pendant l'hybridation (Rasmussen *et al.*, 1991).

Pour permettre cette liaison covalente, des groupements amines secondaires sont greffés solidement sur cette surface. Un brin d'ADN modifié, c'est-à-dire auquel un phosphate en 5' est ajouté, peut ainsi venir se fixer sur ces amines grâce à la présence des carbodiimides, un agent couplant (Remacle *et al.*, 1994).

### **III.5.3. In situ**

L'hybridation *in situ* consiste en une réaction d'hybridation des sondes sur l'ADN des noyaux cellulaires ou sur de l'ARN cytoplasmique. Ce type d'hybridation permet de détecter un gène, un fragment d'ADN ou d'ARN en le marquant. Il rend ainsi possible l'examen des cellules d'un tissu, d'un frottis ou d'une biopsie. L'hybridation *in situ* est assez proche du marquage d'immunocytochimie aussi bien au niveau de la méthode que de ses applications (Remacle *et al.*, 1994).

## **IV. Les biochips : une nouvelle tendance**

### **IV.1. Présentation de cette technologie**

Les biochips dites aussi DNA chips, micro-réseaux ou encore micro-arrays consistent en une miniaturisation des systèmes d'hybridation classique. Elles sont nées d'un mariage entre la biologie moléculaire, la biochimie, la chimie combinatoire, la microélectronique et l'informatique.

Le gros avantage qu'elle présente est de permettre une analyse, une identification et un dosage, en parallèle et simultané de plusieurs centaines de gènes. Il s'agit là d'une véritable performance en comparaison avec les autres techniques (Kurian *et al.*, 1999).

Le système des biochips est à l'heure actuelle encore complexe et très onéreux. En effet, le matériel nécessaire est très pointu, important et coûteux. Malgré cela, l'évolution prédite d'un tel système est très prometteuse et s'annonce rapide. Devant une telle avancée, de nombreux laboratoires de recherche investissent dans ce domaine avec pour objectif une diminution du coût et une utilisation facilitée. C'est ainsi que, dans un futur proche, cette nouvelle technologie pourrait conduire à des changements majeurs dans les approches diagnostiques et autres.

### **IV.2. Principe des biochips**

Le principe de base est relativement simple : il consiste en l'arrangement sur un petit support de différentes séquences ADN dites ADN capteurs. Comme pour de nombreuses techniques de biologie moléculaire, cette technologie repose sur l'hybridation entre deux séquences nucléotidiques complémentaires.

Dans le cadre du « diagnostic », la séquence d'acides nucléiques à étudier est généralement amplifiée, marquée puis hybridée sur le damier de la biochips. L'amplification est nécessaire pour que le matériel génétique se retrouve en quantité suffisante, et c'est peut-être là le point faible du système. Quant au marquage, il permettra de repérer les régions où l'hybridation entre séquences complémentaires aura eu lieu et donc, de déterminer avec quel ADN capteur (sonde fixé sur le support), la sonde étudiée s'est hybridée (Delpech, 2000 ; Hamels *et al.*, 2001).

Les biochips ne sont pas uniquement capables de fournir une information génétique ; elles peuvent également y corréler la fonction biologique. En effet, elles offrent aussi la possibilité d'étudier l'expression des gènes. Dans ce cas, les ARNm extraits des cellules sont rétro-transcrits en ADNc qui seront directement hybridés sur la chips.

Contrairement à l'approche diagnostic, une réaction d'amplification est ici évitée ce qui permet une très bonne quantification de l'expression des différents gènes étudiés par la biochips.

C'est ainsi qu'en une seule étape, une étude de différents gènes, une recherche de mutations ou une étude d'expression de gènes est possible. De plus, les biochips présentent d'autres avantages tels que leur simplicité, leur puissance et leur flexibilité.

### **IV.3. Les supports**

Divers support ont été développés. Cependant, seuls trois sont employés couramment : les polymères, le verre et le silicium.

#### **\* les polymères**

Chimiquement inertes, ils évitent ainsi des réactions chimiques ou interactions parasites entre le support solide et les séquences étudiées.

Pour permettre la fixation covalente des trappeurs, le support doit posséder des groupements fonctionnels. Classiquement, la réaction employée est celle de la base de Schiff qui met en jeu les fonctions aldéhydes présentes à la surface du support et une amine située à l'extrémité de la sonde à fixer (Godfroid, 2000).

#### **\* le verre**

Egalement chimiquement inerte, il est le plus utilisé à l'heure actuelle pour plusieurs raisons : faible coût, transparence, résistance aux hautes températures et également une faible émission en fluorescence (Cheung *et al.*, 1999). De plus, le verre est rigide et ceci représente un avantage par rapport aux polymères car il facilite les manipulations et l'automatisation des procédures (Godfroid, 2000).

#### **\* le silicium**

Présentant les mêmes avantages que ceux du verre, ce matériau est principalement employé par l'industrie électronique dans le développement des puces. En fait, celle-ci consiste en un adressage électronique sur un support chargé positivement.



#### **IV.4. Fabrication du damier**

Vu les différentes conditions requises lors de l'hybridation, l'ADN capteur se doit d'être immobilisé de manière covalente sur le support pour éviter tout risque de détachement.

Quelque soit le support choisi, il existe deux méthodes de fabrication : soit le transfert des sondes ADN soit la synthèse *in situ*.

En ce qui concerne le transfert, ce dernier est effectué grâce à un robot automatisé qui vient déposer une quantité de l'ordre du nanolitre de la solution d'ADN capteur. Ces engins permettent d'atteindre une précision appréciable (10 $\mu$ m) au niveau du dépôt sur le support. Différents spots sont ainsi déposés à un emplacement déterminé par l'expérimentateur sur le support de façon à créer un damier. La taille des sondes ainsi fixées varie entre 40 bases et 500 paires de bases (Godfroid, 2000).

Dans le cas de la synthèse *in situ*, développée par la firme Affimetrix, le processus repose sur l'utilisation de la photolithographie. En fait, la surface de verre présente des groupements aminés protégés par des groupements dits photolabiles. La déprotection se fait *via* un masque de forme définie qui est placé de manière à exposer les groupements de manière sélective. Des oligonucléotides eux-mêmes protégés sont alors ajoutés et viennent se fixer là où il y n'y plus de protection. Ensuite, le processus est répété avec un masque offrant une protection d'autres sites sur le damier. Par cette technique, la limite de taille des sondes capteurs est de seulement 30 bases (Godfroid, 2000). Un point faible de cette technique est l'imperfection c'est-à-dire le manque de fiabilité des procédés de déprotection et de couplage (Delpech, 2000).

#### **IV.5. Détection sur biochips (Figure I.22)**

Pour permettre de déterminer les spots où il y a eu hybridation avec les ADN capteurs, une étape de détection est nécessaire. Des molécules fluorescentes dits fluorochromes comme la cyanine 3, la cyanine 5 ou en encore la fluoréscéine sont très souvent utilisés. La révélation peut se faire de manière directe ou indirecte. Dans le premier

cas, le fluorochrome est incorporé à la sonde, tandis que dans le second, il est couplé à une streptavidine par exemple qui reconnaît une biotine incorporée ou fixée au cible.

La détection se fait grâce à l'exposition de la molécule marquant le cible à la longueur d'onde d'excitation de cette molécule. Une lumière d'une longueur d'onde déterminée est alors émise et permet la détection de la sonde par un scanner à fluorescence.

L'avantage de recourir à un tel procédé est la possibilité d'estimer la proportion de cibles hybridés en fonction de l'intensité de la lumière émise par le fluorochrome. Toutefois, ce système requiert un lecteur dont le coût est assez élevé.

Une autre technique est la détection en colorimétrie à l'argent. Son principe est basé sur l'utilisation de particules d'or catalysant une précipitation de l'argent. Le signal de détection est donné *via* ces particules d'argent précipité. En fait, une particule d'or couplée à la streptavidine se fixe à la sonde biotinylée. C'est alors que des sels d'argent sont ajoutés ainsi qu'un agent réducteur. La bille d'or va catalyser la réduction des sels d'argent qui vont se déposer à l'endroit de l'hybridation (Alexandre *et al.*, 2001).

Cette méthode présente plusieurs avantages : tout d'abord, le dépôt d'ions métallique, processus autocatalytique, permet une amplification du signal plus importante que celui des molécules chromogènes. De plus, le dépôt d'argent réfléchit davantage la lumière dans le spectre du visible permettant ainsi l'utilisation de lecteurs basés sur la réflexion (Alexandre *et al.*, 2001).

## **IV.6. Les applications**

Les applications des biochips concernent plusieurs domaines tels l'identification d'un gène responsable d'une maladie, le séquençage de génome, la découverte de mutations, le développement de nouveaux médicaments, etc. Cela peut en fait se résumer en deux pôles principaux : d'une part, l'identification d'une séquence génomique (ADN) et d'autre part, l'analyse de l'expression des gènes (ARNm).

### **IV.6.1. L'identification d'une séquence génomique**

Dans le domaine de la recherche, les biochips s'appliquent aussi bien au criblage de mutations, à la détection d'organismes ainsi qu'au séquençage.

Ainsi, une mutation, une délétion ou encore une insertion sont facilement détectables *via* les biochips. Leur détection s'effectue par comparaison de l'échantillon testé avec un autre de référence (Bellis *et al.*, 1997). Les biochips permettent aussi de détecter des agents infectieux (Hamels *et al.*, 2001), des séquences d'ADN d'organismes génétiquement modifiés, ... mais également la recherche de gènes responsables de maladies héréditaires. C'est ainsi que diverses études sont menées sur des systèmes expérimentaux de suppression de tumeurs (Kurian *et al.*, 1999).

Quant au séquençage *via* les chips, il a été proposé à la fin des années 80. Jusque là, celui-ci reposait sur la méthode enzymatique de Sanger basé sur une épellation base par base. A l'heure actuelle, la lecture se réalise par petits blocs grâce aux biochips. Le principe est simple : une séquence linéaire est considérée comme un ensemble de sous-séquences chevauchantes qui, au moyen d'un programme informatique adéquat, sont réassemblées et permettent la reconstruction de la séquence étudiée. L'avantage de la technique est non seulement son automatisation mais aussi sa courte durée d'exécution par rapport aux techniques traditionnelles.

Dans le domaine du diagnostic moléculaire, l'ensemble des tests repose directement sur le patrimoine génétique. Ces tests sont notamment réalisés grâce à des chips, ce qui permet d'obtenir des résultats plus rapidement comparé aux techniques de microbiologie. De plus, la spécificité et la sensibilité de cette nouvelle technologie représente un grand avantage. Le diagnostic moléculaire couvre principalement deux pôles d'applications : la détection de maladies infectieuses et celle de maladies génétiques. Pour les premières, le microorganisme responsable est directement détecté *via* des séquences ADN spécifiques sur la biochips. Quant aux maladies génétiques, plusieurs types de biochips permettent de déterminer des prédispositions génétiques. En fait, elles décèlent les mutations indiquant la probabilité que possède un individu d'être atteint de telle ou telle maladie. La fiabilité des biochips est comparable aux techniques classiques mais ils sont plus rapides, plus simples et à terme moins coûteux.

### IV.6.2. L'expression des gènes

L'analyse de l'expression des gènes est une autre domaine d'applications. Elle se fonde sur l'utilisation de biochips dont les sondes sont choisies pour leur spécificité à caractériser un gène donné.

Cette étude vise à déterminer les niveaux et le mode d'expression des protéines ainsi que leurs modifications post-traductionnelles et les relations qui s'établissent entre elles. En effet, en raison de la complexité entre l'environnement, les gènes et leurs produits, des études sur les produits du génome sont nécessaires pour mieux comprendre les processus physiologiques et pathologiques (Godefroid, 2000).

En bref, la science protéomique consiste donc en un inventaire des protéines, leur localisation au niveau des organites, leur niveau d'expression et l'impact sur ce dernier d'une pathologie ou d'un traitement médicamenteux (Godefroid, 2000).

## **V. Objectif du mémoire**

Le sujet de ce mémoire porte sur le Roundup Ready Soybean qui est une variété de soja transgénique développé par la firme Monsanto. En effet, afin de s'assurer de la

faisabilité de notre méthodologie, nous allons d'abord nous concentrer sur un OGM en particulier.

Le soja Roundup Ready, grâce à une modification génétique devient résistant à un herbicide spécifique, le glyphosate, plus connu sous le nom de Roundup également développé par Monsanto. Le développement de ce soja constitue un intérêt certain pour la firme. Elle lui permet en effet de vendre plus d'herbicides en créant une plante résistant spécifiquement à celui-ci (Philipon, 1997). Cela ne se limite pas au soja, d'autres plantes ont également été développées pour résister à cet herbicide comme par exemple le maïs, le coton, la betterave, etc.

Comment agit cet herbicide ? Développé en 1974 par Monsanto, le glyphosate est un herbicide non sélectif à large spectre qui normalement ne peut être appliqué sans causer de blessures à la plante. En fait, il atteint très rapidement les parties actives du métabolisme des pousses aux extrémités des racines. Là, il inhibe l'enzyme EPSPS (5' enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) qui est essentielle à la synthèse d'acides aminés mais également à la formation de vitamines, de phytohormones et de lignine. En inhibant cette EPSPS située dans les chloroplastes, la croissance et même la vie de la plante est touchée.

Mais quels sont les caractéristiques du soja transgénique ? En fait, ce soja constitue une aubaine pour les agriculteurs : ils peuvent utiliser un herbicide efficace pour traiter leurs cultures sans que ce dernier ne provoque de dommages à la plante cultivée et donc sans que le rendement s'en trouve touché. La plante modifiée génétiquement ne tolère toutefois que cet herbicide, le roundup, mais ceci n'a pas empêché que cette variété ait été très vite adoptée par les agriculteurs.

Pourquoi avoir choisi le soja comme centre d'intérêt ? A l'heure actuelle, sa culture constitue une des trois plus importantes productions céréalières aux Etats-Unis. En effet, depuis la seconde guerre mondiale, cette production n'a cessé de s'accroître (Figure I.23.). Quant aux exportations mondiales de soja américains, elles atteignaient environ 60% en 1997/1998 (Gianessi *et al.*, 2000). Non seulement la place importante qu'occupe ces plantes mais également le fait que l'on connaisse en partie le génome du soja modifié ont guidé notre choix des capteurs permettant la détection de plusieurs OGM.

Quant au développement de ce soja transgénique, la résistance fait suite à l'insertion d'un gène CP4 EPSPS provenant d'une bactérie *Agrobacterium Thaliana* sp. strain CP4 au sein du génome du soja. Le produit de ce gène est une version à laquelle le roundup ne peut venir se lier et donc ne peut l'inhiber (Gianessi *et al.*, 2000). Ceci

explique la résistance du Roundup Ready Soybean à cet herbicide. La séquence décrite à la figure I.24.A. a comprend :

- un promoteur 35S qui consiste en une portion du virus de la mosaïque du chou-fleur (CAMV)
- la séquence codante CP4 EPSPS qui apporte la résistance à l'herbicide et la séquence CTP (chloroplast transit peptide) qui provient d'*Arabidopsis Thaliana*
- une partie du gène terminateur, la région 3' non transcrite de la synthase nopaline

(Windels *et al.*, 2001).

Cependant, il y a un an, on a découvert que cette séquence dont la firme Monsanto fait rapport n'est pas tout à fait celle découverte par une équipe de chercheurs belges (Figure I.24.B.). Un segment d'ADN réarrangé a été découvert, celui-ci comprend une partie similaire de CP4 EPSPS (254 bp) ainsi qu'une séquence de 534 bp pour laquelle aucune séquence homologue ne correspond (Windels *et al.*, 2001). La question est peut-être de savoir si la firme était en possession de ces données et les a volontairement cachées ou si la séquence après insertion dans la plante n'avait pas été vérifiée ?

L'objectif de ce mémoire s'inscrit dans le cadre d'un projet qui vise à développer une technique fiable et quantitative de détection des OGM en vue de contrôler la composition et d'étiqueter des aliments. Le recours aux biochips semble adéquat pour atteindre ce but. En effet, les biochips permettent une analyse simultanée de multiples gènes ainsi qu'une détection spécifique. Afin d'assurer une sensibilité suffisante, l'analyse sur biochips doit être couplée à une amplification préalable du matériel. En effet, le test doit être capable de détecter moins de 1% d'OGM présent dans un échantillon puisque 1% est la limite pour l'étiquetage. La technique d'amplification choisie devra répondre à ces différents critères : rapidité, efficacité, coût réduit, pas de risque de contaminations, et surtout permettant une quantification. La CPT répondant à ces critères nous a semblé être une technique intéressante à explorer.

Tout d'abord, nous devons déterminer une séquence spécifique de l'organisme considéré, dans notre cas le soja résistant au roundup, et choisir une sonde pouvant le reconnaître. Cette sonde sera chimérique (ADN-ARN-ADN) et portera une biotine à l'extrémité 3' et une cyanine 3 en 5'. Si il y a reconnaissance, cette sonde placée en excès va venir s'hybrider à son cible et un hybride ADN/ARN est ainsi constitué. La RNase H, enzyme thermostable, va alors reconnaître ce dernier et le cliver au niveau des bases ARN

de la sonde chimérique. Les sondes clivées vont alors se détacher spontanément du cible à cause de leur température de melting plus basse. Celles portant une cyanine 3 nous intéressent tout particulièrement en raison de ce fluorochrome qui permet sa détection au scanner.

Après amplification, dans un échantillon positif (contenant le cible à détecter), on peut trouver des sondes intactes n'ayant pas eu l'occasion de s'hybrider, des sondes clivées biotinylées en 3' et d'autres sondes clivées avec une cyanine 3 en 5'. Dans un échantillon négatif, par contre, on trouve uniquement des sondes chimériques intactes. Pour différencier un échantillon contenant des OGM d'un autre n'en contenant pas, il faut distinguer les sondes clivées portant la cyanine 3 des autres sondes. Les sondes comportant une biotine seront épuisées sur supports coatés à la streptavidine. Seules les sondes clivées avec une cyanine 3 ne seront pas retenues et seront ainsi récupérées pour être hybridées sur biochips. Elles peuvent dès lors s'hybrider à un capteur spécifique de la séquence du soja modifié et seront détectées via leur cyanine 3.

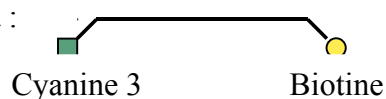
## Matériel et méthodes

---

### I. Description des sondes utilisées

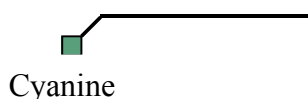
#### I.1. Sonde IVcya/biot :

- Séquence : 5'-GGC-GCT-GGT-GTA-CCG-GAC-GGA-GGA-CTT-3'.
- Particularités : cyanine 3 en 5' et biotine en 3'.
- Utilisation : pour les mises au point de l'étape d'épuisement à la place de la sonde chimérique utilisée lors de la CPT dont le coût est élevé.
- Schéma :



#### I.2. Sonde IVcya :

- Séquence : 5'-GGC-GCT-GGT-GTA-CCG-GAC-GG-3'.
- Particularité : cyanine 3 en 5'.
- Utilisation : sert à mimer le comportement de la sonde clivée (terminée par une cyanine 3) après une CPT.
- Schéma :



#### I.3. Capteur OTiny :

- Particularité : amine C6 en 5'.
- Utilisation : déposé sur la lame de verre et sert de complémentaire à IVcya, IVcya/biot.

#### I.4. Capteur OTCy2b2 :

- Particularité : amine C6 en 5'.
- Utilisation : sert de capteur au cible Cy2b2, décrit comme contrôle d'hybridation positif.



### **I.5. Cible OCCy2b2 :**

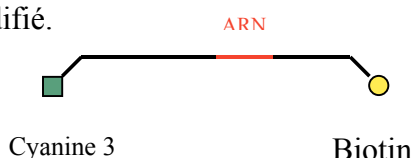
- Séquence : 5'-GGG-AAG-TGA-CTC-AGC-ATG-AGA-TGT-G-3'.
- Particularité : cyanine 3 en 5'.
- Utilisation : sert de contrôle positif de l'hybridation en s'hybridant au capteur correspondant.

### **I.6. Capteur OCnf1b :**

- Particularité : amine C6 en 5'.
- Utilisation : sert de contrôle d'hybridation négatif auquel normalement rien ne vient s'hybrider.

### **I.7. Sonde chimérique OCSrrs1 :**

- Séquence : 5'-TAG-GGA-ACC-CAA-ATG-Gaa-aaG-GAA-G-3' (nucléotides en minuscules = ARN).
- Particularités : cyanine 3 en 5', biotine en 3' et présence de 4 bases ARN
- Utilisation : sonde déterminée pour la réalisation de la CPT dans le but de détecter le soja modifié.
- Schéma :



### **I.8. Cible OCCrrs1 :**

- Séquence : 5'-CTT-CCT-TTT-CCA-TTT-GGG-TTC-CTT-A-3'.
- Utilisation : cible auquel vient s'hybrider la sonde chimérique RRS lors des mises au point de la CPT.

### **I.9. Sonde chimérique OCSrrs2 :**

- Séquence : 5'-TAG-GGA-ACC-CAA-ATG-Gaa-aaG-GAA-G-3' (nucléotides en minuscules = ARN).
- Particularités : pas de cyanine 3 en 5' ni de biotine en 3', présence de 4 bases ARN.
- Utilisation : sert lors des mises au point de la CPT suivie d'une détection sur gel de polyacrylamide.

A signaler, toutes sondes possédant une cyanine 3 sont à utiliser à l'abri de la lumière dans le but de préserver l'état du fluorochrome.

## II. CPT

### II.1. Principe

La CPT est une technique d'amplification qui permet la détection d'un ADN cible grâce à l'amplification du signal de détection lui-même.

Cette méthode repose à la fois sur l'utilisation d'une sonde chimérique c'est-à-dire d'une sonde ADN-ARN-ADN s'hybridant à un ADN cible complémentaire et sur l'activité d'une enzyme thermostable, la RNase H, qui reconnaît spécifiquement les hybrides ARN-ADN et les clive au niveau de l'ARN. Suite à ce clivage, deux petits oligonucléotides sont obtenus et se détacheront du cible spontanément. C'est l'accumulation de ceux-ci qui permet l'augmentation du signal de détection.

### II.2. Matériel

- ADN cible (**Eurogentec**, Seraing, Belgique)
- Sonde chimérique terminée en 5' par une cyanine 3 et en 3' par une biotine (**Eurogentec**, Seraing, Belgique)
- Tampon Cycling Buffer (CB) 10X :
  - Tris-HCl 500mM pH 8,1 (**Merck**, Darmstadt, Allemagne)
  - MgCl<sub>2</sub> 80mM (**Merck**, Darmstadt, Allemagne)
  - Triton X-100 0,25% (**Sigma**, Saint-Louis, USA)
- RNase H de *Thermus Thermophilus* 0,605 µg/µl (**ID Biomedical**, Vancouver, Canada)
- Eau distillée
- Bloc chauffant – Dri Block DB-2D (**Techne**, Cambridge, Angleterre)

### **II.3. Méthode**

Pour un volume final de 15  $\mu$ l, on place 5  $\mu$ l contenant différentes concentrations en ADN cible, dilué dans du tampon CB 1X. A ces 5  $\mu$ l, 10  $\mu$ l de mix sont ajoutés. Ce dernier comprend 1  $\mu$ l de CB 10X ; 3,83  $\mu$ l d'eau distillée ; 0,17  $\mu$ l de RNase H pour une quantité finale de 0,1  $\mu$ g (correspondant à 5,7 pmoles) et 5  $\mu$ l de sonde chimérique (100 fmoles). Durant l'addition de la solution mix, les microtubes sont conservés sur glace pour éviter l'action de la RNase H alors que l'amplification n'a pas encore commencé.

Une fois tous les échantillons prêts, ils sont placés sur un bloc chauffant à 70°C pendant 30 minutes. Ensuite, afin de stopper la réaction, ils sont refroidis sur glace. Pour terminer, le produit de la réaction est entièrement récupéré pour être épuisé grâce à l'étape suivante et ce, dans le but de séparer les sondes clivées terminées par une cyanine 3 des autres sondes intactes ou clivées mais terminées par une biotine.

A côté de cela, deux contrôles, C1 et C2, sont réalisés. Le premier (C1) ne contient ni cible ni RNase H. Il sert à s'assurer de l'intégralité de la sonde tout au long de la réaction. Quant au C2, où seul le cible est absent de la réaction, il sert à vérifier qu'il n'y a pas de structures secondaires incluant les bases d'ARN de la sonde qui pourrait donner lieu à un clivage non spécifique.

### **II.4. CPT avec détection sur gel de polyacrylamide**

#### **II.4.1. Principe**

La sonde OCSrrs2 est tout d'abord marqué par un [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP. La polynucléotide kinase et son tampon d'activation ont pour but de phosphoryler l'extrémité 5' des sondes avec cet ATP radioactif.

Une fois marquées, ces sondes sont purifiées dans le but d'éliminer les éléments radioactifs non incorporés. Pour ce faire, on utilise des spins colonnes dont le principe est basé sur une séparation de poids moléculaire. Les molécules de poids moléculaires supérieur à la porosité du gel se retrouve dans le volume mort de la colonne et s'éluent donc très vite. Par contre, celles de faible poids moléculaire passent dans l'entièreté du volume de la colonne et sortent donc bien après.

Suite à la CPT, le produit de celle-ci est déposé sur un gel dénaturant. Ce gel est employé pour séparer des ADN simples brins de longueurs différentes. Le gel est soumis à un

champ électrique qui conduit à la migration des fragments d'ADN vers la borne positive. La vitesse de ces fragments dépend de leur taille ; plus ils sont petits, plus la migration est rapide. C'est donc de cette manière que l'on distingue les sondes clivées des non clivées.

#### II.4.2. Matériel

- Sonde chimérique OCSrrs2 (sans cyanine 3 ni biotine) (**Eurogentec**, Seraing, Belgique)
- T4 polynucléotide kinase (**Promega**, Madison, USA)
- Tampon d'activation de la T4 polynucléotide kinase (**Promega**, Madison, USA)
- [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP (10  $\mu$ Ci/ $\mu$ l) (**NEN**, Boston, USA)
- H<sub>2</sub>O stérile
- EDTA 0,25 M (**Merck**, Darmstadt, Allemagne)
- Quick spin colonne Sephadex G25 (**Roche**, Mannheim, Allemagne)
- Centrifugeuse (**Vel**, Louvain, Belgique)
- Tampon TE :
  - Tris-HCl 10 mM pH 8 (**Merck**, Darmstadt, Allemagne)
  - EDTA 1 mM (**Merck**, Darmstadt, Allemagne)
- Geiger (**Sercolab**, Malines, Belgique)
- Aqualuma (**Lumac**, Groningen, Pays-Bas)
- Compteur à scintillation (**Packard**, Downers Grove, USA)
- Acrylamide/bisacrylamide 30/08 (**Bio-Rad**, Munich, Allemagne)
- TBE 10X (**Gibco**, Paisley, Angleterre )
- Urée ultrapure (**Merck**, Darmstadt, Allemagne)
- Amonium persulfate (APS) (**Pharmacia Biotech**, Uppsala, Suède)
- TEMED (**Pharmacia Biotech**, Uppsala, Suède)
- Plaques et cuves électrophorèse (**Gibco**, Paisley, Angleterre )
- ADN cible OCCrrs1 (**Eurogentec**, Seraing, Belgique)
- Tampon Cycling Buffer (CB) 10X :
  - Tris-HCl 500mM pH 8,1 (**Merck**, Darmstadt, Allemagne)
  - MgCl<sub>2</sub> 80mM (**Merck**, Darmstadt, Allemagne)
  - Triton X-100 0,25% (**Sigma**, Saint-Louis, USA)
- RNase H de *Thermus Thermophilus* 0,605  $\mu$ g/ $\mu$ l (**ID Biomedical**, Vancouver, Canada)
- Bloc chauffant – Dri Block DB-2D (**Techne**, Cambridge, Angleterre)

- Solution de bleu pour gel de polyacrylamide dénaturant :
  - Urée 8 M (**Merck**, Darmstadt, Allemagne)
  - EDTA 100 mM (**Merck**, Darmstadt, Allemagne)
  - Bleu de bromophénol 0,25% (**Merck**, Darmstadt, Allemagne)
  - Xylène cyanol 0,25% (**Sigma**, Saint-Louis, USA)
- Papier absorbant et cellophane
- Instant Imager (**Packard**, Downers Grove, USA)

### II.4.3. Méthode

#### a) Marquage de la sonde chimérique

Pour un volume final de 10  $\mu$ l, on place 1  $\mu$ l de sonde contenant 10 pmoles d'ADN, 1  $\mu$ l de T4 polynucléotide kinase (10 U/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l de tampon kinase 10X, 1  $\mu$ l d'ATP radioactif (10  $\mu$ Ci/ $\mu$ l) et 6  $\mu$ l d'eau stérile. Le tout est placé dans un microtube et incubé 30 minutes dans un bain à 37°C. Suite à ce temps d'incubation, on ajoute au mix 1  $\mu$ l d'EDTA 0,25 M qui a pour rôle de stopper la réaction ainsi que 10  $\mu$ l d'eau stérile pour avoir un volume suffisant lors de la purification.

#### b) Purification des sondes radioactives

Avant de commencer le gel de la colonne est resuspendu en l'inversant plusieurs fois. La colonne est placée dans un tube de 10 ml contenant un eppendorf et centrifugée 2 minutes à 2400 rpm. Le gel de la colonne est alors tassé.

Les 21  $\mu$ l d'échantillon de sondes marquées sont déposées au-dessus du gel (au centre). On centrifuge alors pendant 2 minutes à 2400 rpm. La colonne est ensuite rincée deux fois avec 50  $\mu$ l de TE et centrifugée selon les mêmes conditions que précédemment. Un nouvel eppendorf est utilisé à chaque centrifugation.

Le comptage de la quantité de sondes marquées est réalisé au moyen d'un compteur à scintillation ; 4  $\mu$ l de chaque fraction récupérée sont placés dans 400  $\mu$ l d'eau stérile, on en prélève 100  $\mu$ l (3X) auquel on ajoute 5 ml d'aqualuma et on compte. Ensuite, les fractions correspondant à la sonde marquée sont déterminées et regroupées. Le tout est stocké à -20°C.

Les sondes sont alors prêtes pour l'étape d'amplification.

c) Préparation du gel dénaturant

Afin de permettre une bonne séparation entre la sonde non clivée de 25 bases et la sonde clivée de 18 bases, le gel réalisé est très concentré, 20%. Pour 50 ml de gel, on réalise le mix suivant : 33 ml de solution acrylamide/bisacrylamide 30/0.8 , 5 ml de TBE 10X et 21 g d'urée ultrapure. De l'eau est ajoutée pour atteindre 45 ml. On attend alors que l'urée se dissolve à température ambiante. Une fois que l'urée est complètement dissoute, de l'eau est ajoutée afin d'ajuster au volume final.

Au dernier moment, avant de couler le gel entre les deux plaques de verre, 500 µl d'APS 10% et 10 µl de TEMED sont ajoutés. Ces derniers sont nécessaires à la polymérisation du gel qui demande environ 1 heure. Ensuite, le gel est placé dans une cuve d'électrophorèse avec 1 litre de tampon TBE 1X.

Un prérun est alors réalisé pendant 45 minutes à 200 V afin d'obtenir une homogénéité du tampon et vérifier le bon déroulement de la migration. Pour ce faire, on réalise un prérun avec 10 µl de bleu.

d) Amplification par CPT et détection sur gel de polyacrylamide

Le procédé de la CPT est celui décrit ci-dessus au point II.3.

Une fois que les 30 minutes de réaction sont écoulées, on place sur glace pour stopper l'action de la RNase H et donc la réaction. Ensuite, 15 µl de bleu sont ajoutés à chaque échantillon. Juste avant de déposer sur gel, on dénature 10 minutes à 94°C. Ensuite, on dépose donc sur le gel de polyacrylamide dénaturant et la migration s'effectue 3 heures à 200 V.

Suite à la migration, le gel est démoulé et séché 1 heure à 80°C entre papier absorbant et cellophane.

Pour finir, la lecture des résultats est effectuée avec un Instant Imager.

### III. Epuisement sur puits coatés à la streptavidine

#### III.1. Principe

Cette étape a pour objectif de séparer les sondes non clivées possédant une biotine à leur extrémité 3' de celles n'en possédant plus suite à la CPT. Ainsi, seules les sondes clivées terminées par une cyanine sont récupérées pour être hybridées sur biochips.

Cette séparation est basée sur une fixation impliquant la liaison "streptavidine-biotine". En effet, les puits utilisés sont préconditionnés avec de la streptavidine et donc capables de retenir les sondes terminées par une biotine (clivées ou non).

#### III.2. Matériel

- Puits coatés à la streptavidine (**Roche**, Mannheim, Allemagne)
- Feuilles autocollantes (**Roche**, Mannheim, Allemagne)
- Sonde ADN IVcya/biot et IVcya (**Eurogentec**, Seraing, Belgique)
- Tampon Cycling Buffer (CB) 10X :
  - Tris-HCl 500mM pH 8,1 (**Merck**, Darmstadt, Allemagne)
  - MgCl<sub>2</sub> 80mM (**Merck**, Darmstadt, Allemagne)
  - Triton X-100 0,25% (**Sigma**, Saint-Louis, USA)
- PBS fraîchement préparé (Phosphate Tampon Saline) :
  - K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10mM pH 7,4
  - NaCl 150mM (**Merck**, Darmstadt, Allemagne)
  - Eau distillée
- Plaque Costar 96 puits (**Corning**, New-York, USA)
- Fluorimètre (**BMG Lab Technologies**, Allemagne)
- OliGreen ( **Molecular Probes**, Eugene, USA)
- Tampon TE :
  - Tris-HCl 10mM pH 7,5 (**Merck**, Darmstadt, Allemagne)
  - EDTA 1mM (**Merck**, Darmstadt, Allemagne)



### **III.3. Méthode**

Pour faciliter la compréhension de cette méthode, nous distinguons d'une part l'optimisation de l'étape d'épuisement proprement dite et d'autre part l'épuisement suite à une CPT.

Toutes les manipulations faisant intervenir des sondes dont l'extrémité comprend une cyanine 3 sont réalisées à l'abri de la lumière afin de préserver l'état du fluorochrome.

En ce qui concerne les tests d'optimisation de l'épuisement, seule la sonde IVcya/biot possédant à la fois une cyanine 3 et une biotine est utilisée (Voir I.1). En effet, celle-ci nous permet d'évaluer le pourcentage de sondes réellement fixées par une lecture au fluorimètre via l'excitation-émission de la cyanine 3.

15  $\mu$ l de sondes diluées à une concentration définie dans du tampon CB 1X sont ajoutés à 25  $\mu$ l de PBS et sont placés dans un puits coatés à la streptavidine. Des blancs correspondants sont réalisés : la sonde diluée est remplacée par du tampon CB 1X. Une première lecture au fluorimètre est réalisée dans le but de déterminer les unités fluorescentes relatives émises par l'ensemble des cyanines présentes dans les puits avant la fixation. En fait, la cyanine 3 est excitée à une longueur d'onde de 515 nm et réémet à une longueur d'onde de 555 nm traduit par le lecteur en RFU (Relative Fluorescent Units). Les blancs sont soustraits des valeurs brutes et nous fixons à 100% les valeurs obtenues.

Ensuite, la fixation s'effectue dans des conditions suivantes : une heure, à 37°C et sous une agitation de 60 rpm (toujours à l'abri de la lumière).

Après ce temps d'incubation, le surnageant est prélevé des puits et placé dans d'autres puits non coatés. D'autre part, 40  $\mu$ l de PBS sont placés dans les puits coatés venant d'être vidés. Une seconde lecture au fluorimètre est alors réalisée sur les deux types de puits. Les valeurs obtenues auxquelles les blancs ont été soustraits sont exprimées en pourcentage par rapport aux valeurs obtenues pour le 100% (décrit ci-dessus). Par conséquent, nous savons estimer le pourcentage de sondes fixées sur les puits coatés à la streptavidine.

Lorsqu'une CPT a eu lieu, tout le mélange (15  $\mu$ l) est récupéré et placé dans un puits coaté à la streptavidine et 25  $\mu$ l de tampon PBS y sont ajoutés. La fixation proprement dite a lieu pendant 1 heure à 37°C sous agitation à 60 rpm et à l'abri de la lumière. A la fin de l'incubation, les 40  $\mu$ l sont récupérés pour l'étape d'hybridation sur biochips (Voir VI).

### **III.4. Quantification de sondes par l'OliGreen**

L'OliGreen est un réactif fluorescent qui permet la quantification d'oligonucléotides ou de simples brins d'ADN en solution en s'intercalant à l'intérieur de ceux-ci. Il a donc été utilisé dans le but de permettre une détection plus sensible de sondes présentes dans le puits. En pratique, l'OliGreen doit être dilué 200X au final : diluer 100X dans du tampon TE, ensuite, placer 50 µl de cette dilution dans les puits avec les 50 µl de sondes diluées dans du CB 1X. Pour les blancs, les sondes sont remplacées par 50 µl de tampon CB 1X. Ces puits subissent alors un épuisement sous les conditions citées auparavant c'est-à-dire 37°C, une heure et sous une agitation de 60 rpm. Ensuite, ces puits sont vidés et 100 µl d'OliGreen dilué 200X y sont placés. Une lecture au fluorimètre est réalisée pour permettre la détection. L'OliGreen est en fait excité à une longueur d'onde de 485 nm et réémet à une longueur d'onde de 520 nm.

En ce qui concerne les 100%, on ne peut procéder comme auparavant ; en fait, l'épuisement ne peut se dérouler en présence d'OliGreen, c'est pourquoi ils sont réalisés à part. On place 50 µl de sondes diluées dans du tampon CB 1X à différentes concentrations et 50 µl d'OliGreen. Ensuite, une lecture est réalisée au fluorimètre.

Suite à ces lectures, les valeurs des blancs sont soustraites des valeurs brutes et ces dernières sont exprimées en pourcentage par rapport aux valeurs obtenues pour le 100%.

## IV. Epuisement sur billes magnétiques coatées à la streptavidine

### IV.1. Principe

L'objectif de cette étape est le même que celui décrit pour les puits coatés à la streptavidine ; en l'occurrence, séparer les sondes non clivées portant une biotine et une cyanine 3 à leur extrémité des sondes clivées portant uniquement une cyanine 3 (Voir III).

Le principe de la fixation sur billes coatées à la streptavidine est identique à celui sur puits : une liaison s'établit entre streptavidine et biotine (Figures II.1. et II.2.). Ce qui diffère, c'est la possibilité de faire varier la quantité de billes au sein de l'échantillon et donc de pouvoir contrôler la quantité de streptavidine mise en présence des sondes. D'après la firme, un milligramme de billes magnétiques coatées à la streptavidine lie généralement 200 pmoles d'oligonucléotides biotinylés (single stranded). De plus, les billes présentent l'avantage de se répartir de manière homogène dans l'ensemble de l'échantillon ce qui favorise les chances de liaison biotine-streptavidine.

### IV.2. Matériel

- Billes Dynabeads M-280 Streptavidine (**Dynal**, Oslo, Norvège)
- Sonde ADN IVcya/biot (**Eurogentec**, Seraing, Belgique)
- Tampon Cycling Buffer (CB) 10X :
  - Tris-HCl 500mM pH 8,1 (**Merck**, Darmstadt, Allemagne)
  - MgCl<sub>2</sub> 80mM (**Merck**, Darmstadt, Allemagne)
  - Triton X-100 0,25% (**Sigma**, Saint-Louis, USA)
- Tampon « billes » 2X :
  - Tris-HCl 10mM pH 7,5 (**Merck**, Darmstadt, Allemagne)
  - EDTA 1mM (**Merck**, Darmstadt, Allemagne)
  - NaCl 2 M (**Merck**, Darmstadt, Allemagne)
- Eau distillée

- Support magnétique (**Dynal**, Oslo, Norvège)

### **IV.3. Méthode**

L'épuisement se déroule en deux étapes : la préparation des billes et ensuite l'épuisement en lui-même.

#### **IV.3.1. Préparation des billes**

Les billes magnétiques sont fournies dans du PBS pH 7,4 contenant 0,1% BSA et 0,02% NaN<sub>3</sub> ; cette étape de préparation permet entre autre d'éliminer le NaN<sub>3</sub> (ajouté comme conservateur).

Premièrement, le stock de départ des billes est resuspendu en agitant doucement le tube jusqu'à obtenir une suspension homogène.

Ensuite, une quantité déterminée de billes est prélevée en fonction des besoins de la manipulation (concentration stock = 10 mg/ml) et placée dans un eppendorf. Ce dernier est alors déposé sur un support magnétique (Figure II.3), on attend une minute que l'effet de magnétisme ait lieu puis on élimine le surnageant sans toucher aux billes. Un volume de « tampon billes » 2X est alors ajouté (identique à celui calculé pour déterminer la quantité de billes) et le tout est replacé sur le support. Le surnageant est à nouveau éliminé et un second lavage est réalisé de la même manière. Pour terminer, les billes sont resuspendues dans du « tampon billes » 2X à une concentration de 1µg/µl.

#### **IV.3.2. Epuisement proprement dit**

Le protocole qui suit a été utilisé lors des optimisations de cette méthode d'épuisement. Plusieurs paramètres ont été testés afin de déterminer lesquels sont capables d'épuiser un maximum (si pas la totalité) des sondes terminées par une biotine. C'est pourquoi lors de ces mises au point, seule la sonde IVcya/biot portant une cyanine 3 en 5' et une biotine en 3' est utilisée.

Pour un volume final de 45 µl, il y a une quantité déterminée de billes (22,5 µg), la sonde ADN IVcya/biot diluée dans de l'eau distillée ou du tampon CB 1X sans triton (100 fmoles au final) et enfin du « tampon billes » 2X. Le mélange est incubé dix minutes à

température ambiante sous agitation légère (200 rpm). Suite à ce premier épuisement, l'eppendorf est placé sur le support magnétique et le surnageant est récupéré pour subir un deuxième épuisement. A chaque nouvel épuisement, 22,5 µg de billes fraîchement préparées et dont le surnageant a été éliminé, sont placées dans un nouvel eppendorf, mis sur le support magnétique ; ceci évite d'augmenter le volume au cours des épuisements successifs. Le surnageant issu de l'épuisement précédent peut alors être ajouté à ces billes.

Pour terminer, le surnageant obtenu lors du dernier épuisement est récupéré pour l'hybridation. Cette dernière nous indique si l'ensemble des sondes IVcya/biot se sont fixées aux billes grâce à leur biotine. Si c'est le cas, aucune fluorescence ne doit être émise au niveau des spots correspondant aux capteurs de l'invertase du maïs.

Lorsque l'épuisement sur billes magnétiques coatées à la streptavidine fait suite à une CPT, on place le produit de la CPT avec une quantité déterminée de billes (22,5 µg) et du « tampon billes » 2X. Le procédé est identique à celui décrit ci-dessus. Suite à un premier épuisement, l'eppendorf comprenant ce mélange est également placé sur un support magnétique et le surnageant est récupéré. Pour les épuisements suivants, le surnageant est placé sur une quantité de billes de laquelle le surnageant a été éliminé. Lors du dernier épuisement, le surnageant récupéré est hybridé.

## **V. Fixation des capteurs sur lame de verre (spotting)**

## V.1 . **Principe**

Les sondes ADN, dites sondes capteurs, sont immobilisées sur un support de verre. Oligonucléotides synthétisés chimiquement, les sondes capteurs servent à hybrider un cible ADN présent en solution. L'immobilisation sur le support de verre fonctionnalisé s'effectue via une liaison covalente entre l'amine à l'extrémité 5' de la sonde ADN et le groupement aldéhyde présent sur la lame de verre. En fait, la réaction correspond à une attaque nucléophile de l'amine primaire en position 5' de l'ADN sur le carbone de la fonction carbonyle. Le résultat final est la formation d'une imine (base de Schiff) (Figure II.4.).

L'opération de spotting c'est-à-dire déposer les sondes ADN sur les lames selon un design prédéterminé par l'expérimentateur s'effectue grâce à un robot. Ce dernier se trouve dans un local où la température, la pression et l'humidité relative sont contrôlées.

Pratiquement, le robot prélève la solution d'ADN capteur (de l'ordre du nanolitre) à l'aide d'une aiguille de 250 µm de diamètre. Celle-ci vient traverser une goutte de la solution (sans la faire éclater), placée au centre d'un anneau ; ensuite, la solution est déposée sur la lame de verre à l'endroit déterminé.

Le diamètre des spots obtenus sur la lame de verre est d'environ 400 µm en raison de l'étalement de la goutte. Quant à la distance entre deux spots, elle est de 800 µm.

Entre chaque prélèvement de solution d'ADN différente, le robot lave à plusieurs reprises l'aiguille et la sèche afin d'éviter les contaminations entre les spots sur le damier.

Les différentes solutions d'ADN qui se retrouvent sur la chips sont : l'ADN capteur spécifique du cible de l'invertase du maïs (double triplicat), les contrôles positifs d'hybridation, les contrôles négatifs d'hybridation et les contrôles de fixation (Figure II.5.A). Le contrôle positif (triplicat) correspond à un cytochrome 2b2 dont le cible complémentaire est déposé volontairement dans la solution d'hybridation. Ce contrôle permet de vérifier que l'hybridation a eu lieu correctement. Quant aux négatifs (triplicat), il consiste en des sondes de capture spécifique du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (absent chez les plantes) pour lesquelles aucune trace de cible ne se trouve dans la solution d'hybridation. Tous deux servent à vérifier le bon déroulement de l'hybridation. Concernant le contrôle de fixation, il sert à vérifier l'étape de fixation des sondes capteurs (duplicat) : il s'agit d'ADN de capture multibiotinylés.

## V.2. Matériel

- Robot (**Wow**, Nannine, Belgique)
- Aiguille (**Affimetrix**, USA)
- Lames Diaglass (**AAT**, Namur, Belgique)
- ADN capteur OTinv avec une amine C6 en 5' (**Eurogentec**, Seraing, Belgique)
- Eau distillée
- 384 well plate Clear Sterile (**Nunc International**, USA)
- Solution de spotting (**AAT**, Namur, Belgique)
- SDS 10% (**Merck**, Darmstadt, Allemagne)
- NaBH<sub>4</sub> (sodium borohydrure) (**Aldrich Chemical**, Milwaukee, USA)
- PBS fraîchement préparé (Phosphate Tampon Saline):
  - K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10mM pH 7,4
  - NaCl 0,9% (**Merck**, Darmstadt, Allemagne)
  - Eau distillée
- EtOH absolu (**Carlo Erba**, Rodano, Italie)
- Portoir métallique pour lames
- 2 bacs de lavage en verre

## V.3. Méthode

### a) Préparation des solutions

La solution d'ADN capteur spécifique du cible ainsi que les solutions des contrôles d'hybridation positifs et négatifs sont spottées à une concentration finale de 3 µM. Quant au contrôle de fixation, la concentration spottée est de 50 nM. Pour un volume final de 50 µl, le mélange est constitué de : 10 µl d'ADN capteur à la concentration définie ci-dessus et d'une solution de spotting.

Ensuite, les différentes solutions sont déposées délicatement sur la paroi des puits de la microplaque de 384 puits. Avant de passer à l'étape suivante, il est important de vérifier l'absence de bulle dans les puits afin que le robot prélève bien la solution.

### b) Spotting

Préparer deux berlines de 250 ml rempli avec 200 ml d'eau distillée (l'aiguille ne doit être immergée qu'en partie), berlines dans lesquels une agitation et une sonication de l'eau améliorent le nettoyage de l'aiguille avant que celle-ci ne soit séchée.

Les lames fonctionnalisées à l'aldéhyde sont déposées sur le plateau ; elles sont maintenues grâce à des petits caoutchoucs et trois petits butoirs. Pour assurer une meilleure adhésion, les caoutchoucs sont nettoyés avec de l'isopropanol.

La plaque 384 puits est déposée à l'endroit prévu et est maintenue à 15°C grâce à un circuit dans le portoir de la plaque. A cette température, on évite tout échauffement, donc toute évaporation et ainsi toute variation de concentration.

L'expérimentateur programme le design du damier sur le robot en définissant les différents transferts des puits vers les lames ainsi que le nombre de damiers par lame (dans notre cas 3 par lame) (Voir II.5.B) et le nombre de lames.

L'opération de spotting est alors lancée. A la fin du programme, les lames sont laissées une heure à température ambiante avant d'être lavées.

### c) Lavage des lames

Afin d'obtenir de l'ADN simple brin fixé de manière covalente sur les lames de verre, cinq types de lavages sont effectués. Pour cela, les lames sont placées sur le portoir métallique et l'ensemble des lavages se réalise à température ambiante. Le porte-lame placé dans un bac en verre contient deux litres de chaque solution de lavage.

Les lames sont d'abord placées 2 minutes dans du SDS 0,2%, et sont ensuite lavées deux fois 2 minutes à l'eau distillée. Le lavage suivant s'effectue dans un autre bac : laver une fois 5 minutes avec du NaBH<sub>4</sub> dissout dans du PBS frais 75% et EtOH 25%. Cette solution réductrice sert à rendre inaccessible les fonctions aldéhydes encore libres et transformer les liens imines en amines plus stables. Le lavage qui suit se réalise avec de l'eau distillée pendant 2 minutes. Et pour terminer, les lames sont lavées 3 minutes dans de l'eau bouillante.



Les lames sèchent à température ambiante sur le portoir métallique avant d'être stockées à 4°C jusqu'à leur utilisation.

d) Evaluation du bruit de fond

Avant d'utiliser les lames pour une hybridation, il faut s'assurer que le bruit de fond de celles-ci est correct. Un fond de couleur bleu nuit est attendu, prouvant l'absence de fluorescence non spécifique sur la lame avant hybridation.

L'opération est réalisée sur un petit échantillon de lames prises au hasard. Celles-ci sont scannées au gain 100 du laser.

## VI. Hybridation sur biochips

### VI.1. Principe

La réaction d'hybridation est basée sur la propriété de l'ADN simple brin de se réassocier à la séquence qui lui est complémentaire. Ceci n'est possible que lorsque les conditions sont favorables ; par exemple, il faut que la réaction s'effectue en-dessous de la température de Melting ( $T_m$ ) (la température à laquelle 50% des duplex sont dissociés).

La réaction se déroule en deux temps. La première étape est celle de nucléation au cours de laquelle il y a liaison entre deux courtes séquences de bases complémentaires à la suite de collisions aléatoires. La seconde correspond à l'appariement de l'ensemble des bases adjacentes via une réaction de type "fermeture éclair". Le résultat est la formation d'un double brin comme décrit par Watson et Crick.

Dans ce cas-ci, les brins concernés sont d'une part une séquence ADN fixée sur lame de verre dit « capteur » et d'autre part une séquence ADN complémentaire en solution (Figure II.6.).

### VI.2. Matériel

- Lames spottées avec les capteurs spécifiques (décrits au point IV.1.)
- Chambre d'hybridation (**Wow**, Nannine, Belgique)
- Transparents (**Stabilo**, Heroldsberg, Allemagne)
- Four à hybridation HB-1D (**Techne**, Grande-Bretagne)
- Tampon Cycling Buffer (CB) 10X :
  - Tris HCl 500mM pH 8,1 (**Merck**, Darmstadt, Allemagne)
  - $MgCl_2$  80mM (**Merck**, Darmstadt, Allemagne)
  - Triton X-100 0,25% (**Sigma**, Saint-Louis, USA)
- Sondes ADN simple brin décrites au point I (**Eurogentec**, Seraing, Belgique)
- ADN cible simple brin contrôle positif d'hybridation (cy2b2) marqué à la cyanine 3 en 5' à une concentration de 200  $\mu M$  (**Eurogentec**, Seraing, Belgique)
- Solution d'hybridation (**AAT**, Namur, Belgique)

- Tampon de lavage (WB 1X) (**AAT**, Namur, Belgique)
- Conjugué streptavidine couplé à la cyanine3 (**Sigma**, Saint-Louis, USA)
- Lait en poudre Gloria à 0,01% de matière grasse (**Nestlé**, Vevey, Suisse)
- Parafilm (**American National Can**, Chicago, USA)
- Ordinateur Pentium II (**Dell**, USA)
- Logiciel GMS 418 Array Scanner
- Solution A (**AAT**, Namur, Belgique)
- Solution B (**AAT**, Namur, Belgique)
- Nikon coolscan III (**Nikon**, Corée)

### **VI.3. Méthode**

Toutes les manipulations qui suivent sont réalisées à l'abri de la lumière pour éviter d'exciter inutilement le fluorochrome cyanine 3.

#### **a) Préparation du mélange d'hybridation**

Le mélange pour un volume déterminé est constitué de :

- Soit du surnageant récupéré suite à l'épuisement sur puits ou billes (voir point III et IV), soit d'une quantité définie de sondes avec une cyanine 3 à son extrémité 5'
- 5 µl de cibles cy2b2 pour une concentration finale de 50nM final (=contrôle positif)
- Solution d'hybridation

b) Hybridation proprement dite

Tout d'abord, la chambre d'hybridation est collée sur la lame de verre de façon à délimiter chacun des trois damiers spottés. Le mélange est ensuite déposé au centre du damier. Chaque damier est alors recouvert d'un couvercle découpé dans un transparent afin de sceller la chambre d'hybridation tout en évitant la formation de bulles.

Ensuite, les lames sont placées 2 heures au four à hybridation réglé pour une température de 60°C. A la fin de l'incubation, les lames sont retirées du four et subissent plusieurs lavages.

c) Lavages post-hybridation et détection en fluorescence

La chambre d'hybridation ainsi que les couvercles sont enlevés et les lames placées sur un portoir en verre.

Les étapes qui suivent sont:

- Laver 4 X 2 minutes avec du WB 0,1X + Tween 0,1%
- Laver 1 X 2 minutes avec du WB 0,1X seul
- Scanner (voir point suivant VII)
- Laver 1 X 2 minutes avec du WB 0,1X + Tween 0,1%
- Diluer 500X le conjugué dans du tampon WB 1X + 0,01% de Gloria
- Déposer 800 µl de la solution du conjugué dilué sur un parafilm
- Placer les lames côté damier sur parafilm
- Incuber 45 minutes à température ambiante
- Laver 4 X 2 minutes avec du WB 0,1X + Tween 0,1%
- Laver 1 X 2 minutes avec du WB 0,1X
- Sécher et scanner (voir point suivant VII)

d) Lavages post-hybridation et détection par précipitation à l'argent

Décrite au point IV.5 de l'introduction, ce système est basé sur l'utilisation de particules d'or catalysant la précipitation de l'argent métallique à l'endroit d'une hybridation positive. En effet, l'ADN biotinylé est reconnu par une streptavidine couplée à l'or colloïdal.

Les étapes sont identiques à celles décrites ci-dessus jusqu'à l'avant dernière étape comprise. Ensuite, les étapes sont :

- Mélanger une solution B dans un volume équivalent de solution A
- Déposer 800  $\mu$ l du mélange sur le parafilm
- Incuber au maximum 10 minutes (jusqu'à obtenir des spots visibles et un bruit de fond modéré)
- Stopper la réaction en lavant les lames avec de l'eau
- Laisser sécher les lames et scanner

## **VII. Détection des biochips en fluorescence**

### **VII.1. Principe**

Dans notre cas, la détection des spots pour le contrôle positif d'hybridation et le capteur de l'invertase du maïs s'effectue via l'excitation - émission de la cyanine 3 placée à l'extrémité de l'ADN à détecter. Le conjugué n'est donc pas nécessaire pour cette révélation directe. En ce qui concerne le contrôle de fixation, du CMV multi-biotinylés, la révélation est réalisée par un conjugué streptavidine couplé au fluorochrome de la cyanine 3. En effet, la streptavidine a une forte affinité pour la biotine ( $K_D=10^{-15}M$ ) et donc va se lier sur les biotines présentes sur le capteur. C'est la présence du fluorochrome qui sera alors détectée au scanner.

L'appareil GMS 418 Array Scanner utilisé pour la détection des biochips en fluorescence est basé sur le principe d'un microscope confocal. Il est doté de deux sources de lasers permettant d'exciter deux fluorochromes, en l'occurrence la cyanine 3 (utilisé dans notre cas) et la cyanine 5. Le rayon émis par le laser est réfléchi sur une suite de miroirs qui renvoient un rayon de longueur d'onde différente. La réception de ce rayon permet la formation de l'image avec une intensité qui varie en fonction de la quantité de fluorochrome fixée.

### **VII.2. Méthode**

La lame est introduite dans le scanner puis le focus est réglé en fonction du laser qui sera activé : ici, le canal jaune-orange pour la cyanine 3. La puissance du laser est toujours maintenue à 100% alors que le gain est fixé en fonction de l'application : certains spots saturés au gain 100% peuvent être scannés à un gain plus faible afin de ne plus se révéler saturés.

Ensuite, la lame peut être scannée. Les différents damiers sont sauvés à la fois sous BMP et Tiff. Les images BMP sont mises en page dans Powerpoint. Quant aux images Tiff, elles sont utilisées lors de la quantification des spots.

## VIII. Quantification des spots

### VIII.1. Principe

Le programme Imagene 4.1 permet de déterminer l'intensité de la fluorescence émise par chaque spot du damier. Pixel par pixel, le spot sera décomposé et défini selon une échelle de gris allant de 1 à 65535 niveaux différents. Ce programme permet aussi de déterminer le bruit de fond local autour des différents spots. Cette option a pour but de normaliser les signaux lorsque le bruit de fond n'est pas homogène sur tout le damier.

En pratique, pour un damier défini, il est nécessaire de déterminer une grille spécifique qui s'applique au design propre du damier. Le nombre de lignes, de colonnes et le diamètre moyen des spots sont les différentes coordonnées à entrer dans l'ordinateur. Cette grille s'appliquera à chacun des damiers à étudier et l'ordinateur calcule l'intensité de chaque spot.

Les résultats obtenus seront par la suite traités avec le programme Excel.

### VIII.2. Matériel

- Ordinateur Pentium II (**Dell**, USA)
- Programme Imagene 4.1. (**Biodiscovery**, Californie, USA)
- Excel sous Office 98 (**Microsoft**, Redmond, USA)

### VIII.3. Méthode

Les images sauvées sous Tiff sont importées dans le programme Imagene 4.1. Comme indiqué dans le principe, il faut d'abord créer une grille correspondant au design de notre damier en déterminant le nombre de lignes, de colonnes ainsi que le diamètre maximal et minimal des spots. La grille est placée sur le damier et chaque contour spot est ajusté à la main si nécessaire. La quantification peut alors être effectuée, les valeurs sont exprimées en niveaux de gris.

Les résultats sont enregistrés et traités dans Excel : le bruit de fond spécifique de chaque spot est soustrait de sa valeur brute. La moyenne des répliquats ainsi que leurs écart-types sont calculés pour obtenir un graphe.



## Résultats et discussions

---

### **I. Mises au point sur le gène de l'invertase du maïs**

Afin de rentabiliser au mieux le temps de travail imparti, les différentes mises au point ont d'abord été réalisées sur le gène de l'invertase du maïs. En effet, le matériel était déjà présent au sein du laboratoire. Parallèlement à ces mises au point, la conception théorique de la sonde chimérique permettant la détection du soja Roundup Ready Soybean (RRS) a été réalisée. Par conséquent, la majorité des expériences ont été effectuées sur une partie gène de l'invertase spécifique du maïs. Ce gène code pour une enzyme capable de transformer le saccharose en glucose et en lévulose. Par la suite, les optimisations sont à transférer au cas qui nous intéresse particulièrement, le RRS.

#### **I.1. Tests préliminaires sur l'hybridation**

Différentes vérifications ont été réalisées en hybridation avec la sonde IVcya c'est-à-dire la sonde qui ne possède qu'une cyanine 3 et qui est la sonde accumulée lors de la CPT. Ces tests ont pour but d'assurer la faisabilité de l'hybridation ainsi que de la détection de la sonde IVcya sur biochips.

##### **I.1.1. Test de reconnaissance et de spécificité**

###### **a) Description de l'expérience**

Le but de cette expérience est de vérifier si la sonde reconnaît, et ce de manière spécifique, les capteurs de l'invertase de maïs. De plus, il s'agit également de s'assurer que la détection en fluorescence de cibles portant une seule cyanine est possible. En effet, généralement, la détection se fait via plusieurs fluorochromes : des cibles ayant intégrés plusieurs nucléotides portant des cyanines.

En pratique, la sonde est diluée dans de l'eau (procédure habituelle au laboratoire) et ce, à des concentrations croissantes. L'hybridation se réalise comme décrit au point VI.3 du matériel et méthodes. En fait, on place ces dilutions avec une solution d'hybridation et

du cible contrôle positif, cytochrome 2b2, terminé par une cyanine 3. Ce contrôle doit, lorsque l'hybridation s'est bien déroulée, venir s'hybrider à son capteur sur la biochips. Le mix est déposé sur damier et hybridé pendant 2 heures à 60°C. Pour finir, les différentes lames sont lavées. L'hybridation de la sonde IVcya ainsi que celle du contrôle positif peut être détectée directement au scanner. La détection du contrôle de fixation qui est multibiotynilé nécessite une révélation avec un conjugué streptavidine – cyanine 3. Le contrôle de fixation est biotynilé afin de faciliter le spotting. En effet, celui-ci aurait du se réaliser dans le noir si le contrôle était marqué à la cyanine 3. De plus, la cyanine ne semble pas résister aux lavages post – spotting et une réoptimalisation aurait été nécessaire à cette étape.

### b) Observations (Figure III.1.)

Avant de commencer quelque interprétation que ce soit, définissons la signification des différentes couleurs des spots : le blanc signifie une saturation, ensuite on va du rouge pour des intensités importantes au bleu pour des intensités moindres en passant par le jaune et ensuite le vert.

Les différents contrôles se présentent comme attendu : les contrôles positifs sont allumés tandis que les négatifs ne le sont pas. Ceci signifie que l'hybridation s'est bien déroulée et qu'il n'y a pas de problème de non - spécificité. Quant au contrôle de fixation, ils s'allument également ce qui prouve que les étapes de fixation ont eu lieu correctement.

En ce qui concerne la sonde spécifique de l'invertase du maïs, elle s'hybride correctement à son capteur sur la biochips. On peut donc dire que la reconnaissance est correcte. De plus, on peut observer une gradation d'intensité de fluorescence aux concentrations croissantes. La détection, même à des concentrations très faibles, ne pose pas de problème.

### c) Conclusions

On peut donc en conclure que d'une part la reconnaissance au niveau de l'hybridation est tout à fait correcte et d'autre part que, malgré la présence d'une seule cyanine par sonde, la détection reste possible jusqu'à 20 fmoles.

Donc, on peut continuer à travailler avec ce matériel de départ.

### **I.1.2. Test d'influence du tampon CB sur l'hybridation**

#### **a) Description de l'expérience**

La CPT se déroule impérativement dans le tampon CB où la RNase H développe une activité maximale. Il est donc bon de vérifier que ce tampon ne perturbe pas l'hybridation d'une façon ou d'une autre. En effet, le tampon CB pourrait contenir des composés défavorisant cette étape d'hybridation, il contient notamment du triton qui pourrait donner lieu à une fluorescence non spécifique.

Afin de pouvoir tester l'influence du tampon CB, la sonde est soit diluée dans ce tampon soit dans de l'eau. Trois concentrations sont réalisées : 1 fmoles, 10 fmoles et 100 fmoles. Parallèlement des blancs sont également réalisés dans lesquels on place du CB 1X ou de l'eau à la place de la sonde. Ensuite, les étapes qui suivent sont identiques à celles décrites au point précédent : préparation d'un mix, dépôt sur damier, hybridation, lavages post-hybridation et détection.

#### **c) Observations (Figure III.2.)**

Les contrôles positifs d'hybridation saturent tous (couleur blanche). Par contre, les contrôles négatifs ne s'allument pas. Ces deux types de contrôles prouvent le bon déroulement de l'hybridation. Quant aux contrôles de fixation, ils sont également corrects vu qu'ils sont allumés.

Si l'on compare les résultats obtenus, on peut observer qu'aucune différence n'apparaît lorsque les sondes sont diluées dans du tampon CB ou dans de l'eau. L'hybridation semble tout aussi efficace en présence de tampon CB qu'avec de l'eau.

#### **c) Conclusions**

Le tampon CB ne vient donc pas interférer au niveau de l'hybridation. Ces différents composants ne sont à l'origine d'aucun problème ni lors de l'hybridation ni lors de la détection. Tout se passe correctement : un produit de la CPT peut donc être détecté sur biochips sans problème.

## **I.2. Première mise au point : l'épuisement sur puits coatés à la streptavidine**

Cette étape d'épuisement suivant la CPT a pour but de retenir les sondes non clivées c'est-à-dire celles terminées par une biotine ; de cette façon, seules les sondes clivées ne portant plus qu'une cyanine 3 sont récupérées et hybridées sur biochips. Leur présence sur les capteurs invertase du maïs témoignent d'un échantillon positif.

Cette étape s'effectue grâce à la liaison qui peut s'établir entre la biotine portée par une sonde d'un côté et la streptavidine coatant les puits de l'autre.

Les mises au point pour cette étape n'impliquent pas de CPT préalable afin de mieux contrôler les facteurs qui influencent la fixation.

### **I.2.1. Influence du tampon**

L'épuisement est normalement postérieur à la CPT au cours de laquelle les sondes se trouvent en présence du tampon Cycling Buffer (CB). Ce dernier serait susceptible de troubler la fixation des sondes biotinylées à la streptavidine recouvrant les puits. C'est pourquoi, il est essentiel de s'assurer que le tampon CB n'influence pas négativement le processus. Pour ce faire, il est comparé au tampon PBS utilisé dans une application similaire des dosages de facteurs de transcription par détection colorimétrique (Renard *et al.*, 2001).

#### **a) Description de l'expérience**

Pour une concentration finale de 10 pmoles par puits coatés à la streptavidine, les sondes possédant une cyanine 3 (IVcya) et celles possédant en plus une biotine à l'autre extrémité (IVcya/biot) sont diluées séparément soit dans 40 µl de tampon CB 1X soit dans 15 µl de tampon CB auxquels 25 µl de PBS sont ajoutés. Des blancs sont également réalisés dans lesquels la sonde est remplacée par le tampon correspondant. Pour chaque échantillon test, des triplicats sont réalisées. Avant que la fixation n'ait lieu, une lecture au fluorimètre est réalisée. Les valeurs brutes en RFU auxquelles ont été soustraits les blancs représentent le 100% c'est-à-dire une estimation en RFU de la totalité des sondes déposées dans le puits.

Ensuite, la fixation proprement dite a lieu pendant une heure à 37°C. Après l'incubation, les surnageants sont récupérés et placés dans d'autres puits afin de réaliser une lecture au fluorimètre. Quant aux puits vidés, 40 µl de PBS sont ajoutés pour permettre la lecture. En fait, après excitation et grâce à l'émission de la cyanine 3, on peut déterminer la présence des sondes fixées au fond des puits et l'évaluer par rapport à la quantité totale déposée (100%).

### b) Observations

Trois histogrammes sont illustrés sur le graphique (Figure III.3.) : l'avant-épuisement, le surnageant et le puits. Nous avons considéré l'avant-épuisement comme le 100% c'est-à-dire la totalité de sondes déposées dans le puits. Quant au surnageant, il représente la quantité de sondes présente dans le surnageant et, pour ce qui est du puits, il s'agit de celle s'étant fixées au fond du puits grâce à leur biotine. Ces deux derniers additionnés sont inférieurs à la valeur atteinte par l'avant-épuisement mais cette légère perte s'explique par le fait que l'on ne sait pas vraiment tout reprendre lorsqu'on vide les puits.

Suite à l'observation de ce graphique, aucune différence significative n'est mise en évidence lorsque les sondes subissent l'épuisement sur puits dans du tampon CB seul ou lors d'ajout du tampon PBS.

En effet, les sondes avec une cyanine 3 se retrouvent en majorité dans le surnageant ce qui est logique puisqu'elles ne possèdent pas de biotine, tandis que les oligonucléotides avec une cyanine 3 et une biotine se retrouvent aussi bien dans le surnageant que fixés dans le puits coatés.

### c) Conclusions

Que ce soit en présence de tampon CB seul ou de tampon CB et de PBS, les résultats de fixation, l'épuisement de la sonde avec une cyanine 3 et une biotine est loin d'atteindre les résultats escomptés. En effet, la fixation entre la biotine de la sonde et la streptavidine semble ne pas s'établir comme prévue théoriquement : seulement 40% de liaison sont observées.

Les expériences suivantes sont réalisées avec la sonde diluée dans du tampon CB et du PBS afin de conserver les conditions les plus proches possibles de celles préconisées.

Différents paramètres méritent d'être testés dans le but d'améliorer ce pourcentage : la quantité de sondes par puits, l'influence de la température et du temps de fixation ainsi que l'agitation.

### **I.2.2. Influence de la quantité de sondes par puits**

#### **a) Description de l'expérience**

La sonde IVcya/biot c'est-à-dire celle que l'on doit épuiser, est diluée dans du tampon CB 1X. Différentes quantités de sondes par puits sont alors testées : 40 pmoles, 20 pmoles, 10 pmoles, 5 pmoles et 2.5 pmoles pour un volume de 15  $\mu$ l à chaque fois. A ces 15  $\mu$ l, 25 $\mu$ l de PBS sont alors ajoutés pour obtenir un volume suffisant pour recouvrir le puits. Des triplicats sont réalisés pour chaque quantité de sonde. Pour le reste, les conditions sont celles décrites au point I.1.1.a.

#### **b) Observations**

En observant le figure III.4., on constate que la quantité de sonde fixée augmente avec la quantité de sonde déposée au fond des puits mais pas proportionnellement : plus de 3 pmoles des 5 pmoles déposées se fixent alors que seulement 5 des 10 pmoles déposées se fixent.

Ces valeurs peuvent être exprimées en pourcentage en divisant la quantités de sondes fixées sur la quantité de sondes déposés avant épuisement. Aux quantités plus faibles, 5 et 2.5 pmoles, les valeurs atteignent toutes deux 60% et devient moindre plus la quantité augmente. Etant donné que les valeurs brutes pour 2.5 pmoles sont proches de celles des blancs, cela ne nous sert à rien de diminuer encore les quantités en sondes puisque la limite de détection du fluorimètre ne nous permet pas de descendre davantage.

c) Conclusions

La possibilité d'une éventuelle saturation en sondes peut être écartée après analyse de ces résultats.

Le fait que ça se fixe moins bien pour des quantités plus importantes pourrait s'expliquer par un problème d'encombrement ou encore de temps d'incubation trop court que pour permettre davantage de liaison.

Il serait intéressant de tester des concentrations en sondes inférieures à 5 pmoles afin de voir si la proportion de sonde fixée continue à augmenter.

Pour tenter de répondre à cette question, nous avons essayé une alternative à la cyanine 3 : l'OliGreen. L'OliGreen est un réactif fluorescent qui s'intercale entre les brins d'ADN et permet la quantification d'oligonucléotides ou de simples brins d'ADN en solution. Selon la firme, il permet une détection très sensible. Testés à plusieurs reprises, l'OliGreen ne nous a pas permis de descendre en sensibilité que du contraire la détection n'a en effet été possible qu'aux alentours de 10 pmoles. Ceci pourrait peut être entre autre s'expliquer par des problèmes d'interférences entre l'OliGreen et la cyanine 3 lors de la lecture au fluorimètre. En effet les longueurs d'onde d'excitation-émission de l'un et l'autre sont assez proches : 485 nm et 520 nm pour l'OliGreen et 515 nm et 555 nm pour la cyanine 3.

L'OliGreen ne donnant pas les résultats attendus, nous conserverons la quantité de 5 pmoles pour les tests suivants. Pour cette quantité, le pourcentage de fixation de la sonde est aux alentours de 60%.

### **I.2.3. Influence de la température et du temps**

a) Description de l'expérience

Pour cette expérience, on utilise donc la quantité de 5 pmoles de sondes diluées dans du tampon CB 1X. Les étapes qui précèdent la fixation sont les mêmes qu'auparavant. Pendant l'épuisement, trois températures sont testées : 23°C (température ambiante), 37°C et 53°C ; ainsi que trois temps d'incubation : 1 heure , 1 heure 30 et 2 heures. Chaque test est réalisé en triple.

b) Observations (Figure III.5.)

On peut tout d'abord remarquer que le fait d'augmenter le temps de la fixation n'améliore pas le pourcentage de la fixation.

Quant à la température, un épuisement réalisé à 53°C commence à être légèrement défavorable. Par contre, pour des températures de 23°C et de 37°C, les résultats sont relativement similaires.

Les valeurs du pourcentage de fixation se situent toujours aux environs des 60% comme obtenus lors des mises au point précédentes.

c) Conclusions

L'augmentation du temps n'apporte rien d'avantageux en ce qui concerne la fixation. Par conséquent, le temps d'incubation sera fixé à 1 heure pour des raisons pratiques.

Quant aux différentes températures, il est inutile de passer à des températures trop importantes puisque cela tend à diminuer le pourcentage de la fixation.

En ce qui concerne le choix de la température entre 23°C et 37°C offrant des résultats similaires, nous préférons une température de 37°C ; en effet, celle-ci n'est pas sujette aux aléas climatiques comme peut l'être la température ambiante du laboratoire.

#### **I.2.4. Influence de l'agitation**

En fonction des différents paramètres testés auparavant et désignés comme étant les plus intéressants pour permettre une fixation optimale, l'influence de l'agitation est également un facteur sur lequel il est important de s'attarder. En effet, le fait d'agiter pourrait permettre une meilleure accessibilité des sondes vis-à-vis des streptavidines.

a) Description de l'expérience

Le procédé est identique à celui utilisé pour les expériences précédentes. Est déposé par puits un volume de 15 µl de sondes diluées dans du tampon CB compensé par 25 µl de PBS pour obtenir un volume final de 40 µl. Pour cette expérience, la plaque de puits est placée soit sur table soit sous agitation légère de 60 rpm.



b) Observations (Figure III.6.)

L'agitation semble apporter un effet bénéfique très léger mais qui a pu être observé plusieurs fois.

c) Conclusions

Le bénéfice apporté par l'agitation n'est pas flagrant mais au cours des différentes expériences réalisées, le pourcentage de fixation a toujours été légèrement supérieur sous agitation ce qui nous a conduit à conserver cette légère agitation. A ce stade, plusieurs facteurs ont déjà été testés sans grand succès d'amélioration puisque la fixation reste toujours aux alentours de 60%. Toutes ces manipulations ont été réalisées sur un seul épuisement ; il serait dès lors intéressant de voir ce qui se passe lorsqu'on réalise plusieurs épuisements successifs.

### **I.2.5. Réalisation d'un double épuisement**

Lors de la réalisation du double épuisement, un premier épuisement de 30 minutes est effectué et cela suivant les conditions de température et d'agitation jugées les plus favorables au cours des expériences précédentes (37°C et 60 rpm). Le surnageant récupéré est ensuite transféré dans d'autres puits coatés où la fixation se déroule à nouveau 30 minutes.

Aucune amélioration de la fixation de la sonde au fond du puits n'est apportée même suite à ce double épuisement. En effet, les résultats de fixation (non montrés) se situent toujours aux environs des 60%.

Etant donné que seule la concentration en sonde semble avoir un impact important sur le pourcentage de fixation, nous allons tester des concentrations inférieures à 5 pmoles. Pour ce faire, nous allons détecter les sondes qui n'ont pas été fixées au fond des puits grâce à l'hybridation sur biochips qui va normalement pouvoir pallier au problème de sensibilité de fluorimètre.

### **1.2.6. Épuisement sur puits coatés suivi d'une hybridation sur biochips**

Comme expliquer ci-dessus, si nous voulons diminuer la quantité de sondes déposée sur puits, il est nécessaire de réaliser une hybridation sur biochips pour obtenir des résultats interprétables.

#### **a) Description de l'expérience**

En pratique, trois concentrations de sondes IVcya/biot diluées dans du tampon CB 1X sont testées : 100 fmoles, 10 fmoles et 1 fmole. 15  $\mu$ l de ces dilutions sont placés par puits ainsi que 25  $\mu$ l de tampon PBS. L'épuisement se déroule pendant 1 heure à 37°C et sous une agitation de 60 rpm.

Suite à ce temps d'incubation, le surnageant est récupéré. Des mix d'hybridation sont alors constitués de ce surnageant (40  $\mu$ l), de solution d'hybridation (45  $\mu$ l) et de cible contrôle positif d'hybridation marqué à la cyanine 3 en 5' à une concentration finale de 50nM (5  $\mu$ l). Ensuite, ce mix est déposé sur les damiers et les lames sont alors placées dans un four à hybridation à 60°C pendant 2 heures.

Une fois le temps d'hybridation terminé, les différentes lames sont lavées et une détection en fluorescence est effectuée comme décrit au point VI.3.c du matériel et méthodes.

#### **b) Observations**

Le graphique de la figure III.7. représente l'intensité du niveau de gris en fonction des différentes concentrations en sondes ayant ou non subi un épuisement sur puits coatés à la streptavidine. L'intensité de ces niveaux de gris est en fait une moyenne des spots constituant le contrôle positif, le contrôle négatif ou les capteurs spécifiques de l'invertase. On peut constater que les contrôles positifs d'hybridation ont un signal important tandis que les négatifs eux n'apparaissent pas. Ceci se vérifie pour l'ensemble de ces tests-ci. C'est tout à fait le résultat attendu et cela prouve la bonne spécificité de la l'hybridation.

En ce qui concerne le blanc, on peut également constater que le résultat est également celui attendu, le bruit de fond de la réaction est très faible.

Lorsqu'on compare les résultats obtenus pour des concentrations identiques de sondes ayant subi un épuisement sur puits coatés à la streptavidine et ceux n'en ayant pas

subi, on constate que l'intensité du niveau de gris a diminué suite l'épuisement. En fait, cela s'observe seulement aux concentrations de 1 fmoles et 10 fmoles. A la concentration de 100 fmoles, cette diminution ne s'observe pas : après l'épuisement, le niveau de gris est toujours très élevée. On sature donc toujours à cette concentration.

### c) Conclusions

Au vu de l'ensemble des manipulations réalisées avec les puits coatés à la streptavidine, la fixation de la sonde biotinylée ne s'effectue pas de manière satisfaisante puisque seule une partie des sondes est épuisée. On peut dès lors en conclure que les puits ne conviennent pas pour la réalisation de l'épuisement maximale de la sonde biotinylée. Un plateau de fixation est rapidement atteint peut-être à cause d'encombrements stériques, d'accessibilité de la streptavidine au fond des puits, ...

Après plusieurs tentatives expérimentales pour améliorer la fixation sur puits, sans succès, nous décidons de recourir à une alternative par l'utilisation des billes magnétiques coatées à la streptavidine. Ces billes permettent non seulement de jouer sur leur quantité mais également une homogénéité dans la solution.

## **I.3. Epuisement sur billes magnétiques coatées à la streptavidine**

Les billes magnétiques sont conservées dans du PBS pH 7,4 contenant 0,1% BSA comme agent bloquant et 0,02% NaNO<sub>3</sub> comme agent conservateur. D'un diamètre d'environ 2,8  $\mu$ m, elles sont coatées par une monocouche de streptavidine fixé de manière covalente et lie théoriquement 700 pmoles de biotine. La monocouche de streptavidine présente l'avantage, contrairement aux multi-couches, de ne pas créer d'encombrements stériques qui masqueraient la streptavidine et empêcheraient la fixation du ligand. De plus, cela permet également une haute reproductibilité, une faible variation ainsi qu'une moindre possibilité de perte de streptavidine. En outre, disposées en solution homogène, les billes offrent la possibilité de varier la quantité au sein de l'échantillon et ainsi d'augmenter les chances de liaison entre la biotine de la sonde et la streptavidine recouvrant les billes.

### **I.3.1. Premier test d'épuisement sur billes : influence du tampon CB**

Il s'agit de vérifier si le tampon CB interfère ou non dans la liaison de la sonde biotinylée aux streptavidines coatées sur les billes. Pour rappel, ce tampon est celui dans lequel s'effectue la CPT or notre démarche expérimentale est la réalisation d'une CPT suivie d'un épuisement et puis d'une hybridation.

#### **a) Description de l'expérience**

Les sondes IVcya/biot c'est-à-dire biotinylé en 3' et avec une cyanine 3 en 5' sont à nouveau utilisées comme pour les mises au point de l'épuisement sur puits. Ces sondes sont diluées soit dans du tampon CB 1X soit dans de l'eau pour obtenir 100 fmoles dans 22,5  $\mu$ l. Quant aux billes, elles sont préparées comme décrit dans le matériel et méthodes au point IV.3.

Les sondes sont alors incubées avec les billes resuspendues dans du « tampon billes » 2X (2,5  $\mu$ g/ $\mu$ l) pendant 10 minutes à température ambiante et une agitation lors de chaque épuisement. Suite au premier épuisement, le surnageant est récupéré et placé sur de nouvelles billes auxquelles on a enlevé le surnageant dans le but de ne pas augmenter le volume au cours des épuisements. On effectue ainsi jusqu'à 3 épuisements successifs. Des blancs sont également réalisés ; ceux-ci ne contiennent pas de sondes mais du tampon CB 1X ou de l'eau à la place. De plus, d'autres tests sont aussi effectués et comprennent la sonde diluée mais ces derniers ne subissent aucun épuisement ; ils représentent les 100%.

Le surnageant récupéré lors des derniers épuisements de chaque test est hybridé sur biochips. Pour cela, des mix d'hybridation sont réalisés et comprennent ce surnageant, de la solution d'hybridation et du cible contrôle positif d'hybridation (50 nM final). Chaque mix est déposé sur un damier et on place l'ensemble des lames au four d'hybridation 2 heures à 60°C. Pour terminer, des lavages post – hybridation ainsi que la détection en fluorescence (Voir au point VI.3.c du matériel et méthodes) sont réalisés.

#### **b) Observations**

Un graphique représentant l'intensité du niveau de gris en fonction du nombre d'épuisements réalisés est présenté à la figure III.8. L'intensité du niveau de gris représentée est en fait une moyenne de celle des différents spots constituant soit le contrôle

positif, soit le négatif ou soit les capteurs de l'invertase. Des écart-types sont également intégrés et représentent la variabilité rencontrée entre les différents spots.

En ce qui concerne les différents contrôles d'hybridation, tous sont corrects. En effet, les contrôles positifs montrent un signal important tandis que les négatifs n'apparaissent pas. Toutefois, il est bon de remarquer que certains contrôles positifs sont légèrement plus faibles et ceci s'explique par un petit problème de révélation pour le damier considéré.

Le graphique III.8. nous montre clairement que lorsque les sondes sont diluées dans de l'eau, l'épuisement s'effectue rapidement et presque totalement après trois passages successifs sur billes. Le signal en hybridation est presque au niveau des blancs ce qui signifie que les sondes ont bien été captées par les billes magnétiques. Par contre, si les dilutions ont lieu dans le tampon CB 1X, l'épuisement est loin de se réaliser de manière aussi significative. Après trois épuisements, seule une diminution du signal de moitié est observée.

Pour les blancs, aussi bien dans le CB 1X que dans l'eau, l'intensité est pratiquement nulle au niveau des spots des capteurs de l'invertase. Quant aux 100%, on se situe à une intensité de niveaux de gris proche de la saturation.

### c) Conclusions

Il est clair que le tampon CB gêne considérablement la fixation de la sonde biotinylée à la streptavidine coquant les billes. En effet, la diminution du signal de fluorescence s'effectue plus lentement lorsque les sondes sont diluées dans du tampon CB.

La question est alors de savoir jusqu'à quel épuisement faut-il aller pour obtenir un résultat semblable à ce qui est obtenu lorsque les sondes sont diluées dans de l'eau.

## **I.3.2. Augmentation du nombre d'épuisements**

### a) Description de l'expérience

Vu l'influence négative du CB, les dilutions de la sonde IVcya/biot sont réalisées dans du tampon CB 1X pour un volume plus petit qu'auparavant et on le compense par un apport d'eau. En fait, le volume dans lequel sont diluées les sondes est de 10  $\mu$ l seulement

et l'on ajoute alors 12,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O. Ceci constitue les recommandations de la firme pour l'utilisation des billes.

L'expérience se déroule de manière identique à ce qui est décrit au point précédent à l'exception du nombre d'épuisements qui varie de 0 à 5 épuisements successifs.

b) Observations (Figure III.9.)

Les contrôles positifs et négatifs d'hybridation sont, sur l'ensemble des résultats, corrects.

L'épuisement s'effectue toujours aussi rapidement lorsque les dilutions de la sonde sont réalisées dans de l'eau et l'épuisement est total. Par contre, si les sondes se trouvent dans du tampon CB, même après 5 passages, l'épuisement est encore loin d'être aussi efficace. Il faut attendre le troisième épuisement pour apercevoir une diminution du signal en hybridation ; même après 5 épuisements, on évalue à 40% de sondes réellement fixées aux billes. Le changement de condition concernant le volume n'apporte rien, au contraire.

En ce qui concerne les blancs, le signal correspondant aux capteurs de l'invertase est pratiquement nul pour les deux conditions, dilution dans le CB et dilution dans l'eau.

c) Conclusions

Si l'on s'en tient aux résultats donnés par l'analyse de la figure III.9., il faudrait un nombre impressionnant d'épuisements pour aboutir à un résultat semblable à ceux atteints avec l'eau. Cette solution n'est pas gérable en pratique ; nous nous limiterons donc à 5 épuisements maximum pour les expériences à venir.

Vu les résultats obtenus avec l'eau, on a pensé que l'on pourrait augmenter le volume placé sur les billes en ajoutant de l'eau afin de diluer au maximum le tampon CB.

### **I.3.3. Influence d'une augmentation du volume de la réaction**

Dans le but de diluer un maximum le tampon CB, 25  $\mu$ l d'eau sont ajoutés au 10  $\mu$ l de sondes (100 fmoles), ce qui provoque inévitablement un volume total plus grand lors de l'épuisement (70  $\mu$ l). De plus, en parallèle, l'influence du pH du tampon est testée. En effet, le tampon CB possède un pH de 8,1 alors que celui de l'eau est de 7. Nous

soupçonnons donc le pH de la réaction de ne pas conduire à un épuisement total. C'est pourquoi nous avons fait un tampon CB 1X spécial dont le pH est de 7 cette fois.

Selon les résultats (non montrés), on obtient toujours cet épuisement rapide pour les sondes diluées uniquement dans l'eau. Par contre aucune amélioration n'est apportée que ce soit en augmentant la quantité d'eau ni lorsque le pH du tampon est neutre. En effet, on passe d'un niveau de gris de 65000 à 50000 après 5 passages sur billes ; cela signifie que seulement 23% de sondes se sont fixées aux billes. Les résultats obtenus avec le tampon CB pH 7 ne sont pas meilleurs : environ 15% de sondes fixées.

### **I.3.4. Influence de l'agitation**

On reprend les conditions du point I.2.2. Dans ce cas, l'influence de l'agitation est testée. Pour ce faire, soit une agitation de 200 rpm soit une de 300 rpm sont testées en parallèle. L'expérience a également été réalisée sans aucune agitation, sur table.

Que l'agitation soit de 200 rpm ou 300 rpm, il n'y a aucune augmentation de fixation de sondes aux billes sous l'une ou l'autre agitation. En absence d'agitation par contre, l'épuisement semble moins bien s'effectuer (résultats non montrés).

Vu qu'une agitation est nécessaire mais qu'aucun avantage n'est apporté avec une agitation plus importante, on conserve l'agitation de 200 rpm.

Mais qu'y a-t-il dans le tampon CB qui peut être à l'origine de cette influence négative sur la liaison biotine et streptavidine ? Le triton semble être l'élément le plus probable. Le triton est un détergent non ionique. Généralement en sa présence, les enzymes restent actives (information fournie par la firme Sigma) ; cette enzyme serait donc utilisée dans le tampon CB afin de permettre l'activité de la RNase H durant la CPT.

### **I.3.5. Influence du triton**

#### **I.3.5.1. Sondes diluées dans de l'eau + triton**

##### **a) Description de l'expérience**

Nous avons réalisé en parallèle des épuisements lorsque d'une part les sondes sont diluées dans de l'eau et d'autre part, dans de l'eau à laquelle du triton 0,025% a été ajouté c'est-à-dire le même pourcentage que dans le tampon CB. 10 µl de ces dilutions ainsi que 12,5 µl d'eau sont placés sur billes (22,5 µg). Des blancs sont également réalisés et contiennent soit de l'eau soit de l'eau + triton à la place de la sonde.

De 0 (pour le 100%) à 5 épuisements sont alors effectués sur billes. Le procédé est quant à lui tout à fait identique à celui décrit au point I.3.1.

##### **b) Observations**

Sur la figure III.10., il apparaît nettement que lorsque les dilutions sont réalisées dans de l'eau avec du triton, l'épuisement ne s'effectue plus. Par contre, les résultats avec les sondes diluées dans de l'eau sont toujours aussi satisfaisants. On atteint environ 85% de fixation.

Au niveau des blancs, rien n'apparaît. Quant aux contrôles, tout est correct : les positifsaturent tandis que les négatifs n'apparaissent pas.

##### **c) Conclusions**

Le triton est donc bien l'élément perturbateur à l'origine des problèmes de fixation rencontrés depuis le début avec les billes. Pour s'assurer de ce résultat et se rapprocher de notre cas réel, nous allons dans le point suivant diluer la sonde dans du tampon CB sans triton. Rappelons que le tampon CB est indispensable au bon déroulement de la CPT ; nous devons en tenir compte lors des épuisements sur billes.



### I.3.5.2. Sondes diluées dans du tampon CB sans triton

#### a) Description de l'expérience

Cette fois, on va réaliser les dilutions de sondes dans du tampon CB sans triton, afin de confirmer l'influence néfaste du triton. L'expérience se déroule comme décrit au point précédent.

#### b) Observations (Figure III.11.)

Il faut tout d'abord signaler qu'un problème s'est posé lors de l'hybridation pour le troisième épuisement ; ce qui se traduit par une absence de saturation pour le contrôle positif. Ce phénomène est dû au bruit de fond très élevé de ce damier. Un tel bruit de fond peut être dû à de l'air qui se serait inséré dans la chambre d'hybridation ou peut-être encore à une lame défectueuse. Quant aux autres contrôles positifs, tous saturent (couleur blanche). Et les contrôles négatifs sont également tous comme prévu et n'apparaissent donc pas.

On peut constater que l'épuisement a bien lieu et ce de manière rapide et significative. En effet, le 100% n'ayant pas subi d'épuisement se situe aux alentours de 56000 d'intensité de niveau de gris et que, au plus il y a eu d'épuisements, au plus ce niveau de gris diminue pour atteindre au final un niveau de gris légèrement supérieur à 15000. En d'autres termes, cela signifie qu'environ 75% de sondes se sont fixées aux billes.

#### c) Conclusions

On peut donc en conclure que le triton est effectivement l'élément du tampon CB qui vient influencer négativement l'épuisement de la sonde sur les billes. Mais la CPT se déroulerait-elle correctement avec un tampon CB sans triton ?

#### **I.4. Mise en évidence des produits de la CPT sur biochips**

Vu les résultats présentés sur les billes au point I.3., nous savons que seulement une grande partie des sondes se lient efficacement aux streptavidines et non la totalité. Cette donnée nous pose un problème et est à garder impérativement en tête lors de l'analyse après hybridation.

Les différents protagonistes présents suite à une CPT sont les sondes intactes et les sondes clivées. Pour simuler la réaction, nous allons donc réaliser un épuisement suivi d'une hybridation avec la sonde IVcya/biot et la sonde IVcya. Vu l'épuisement insatisfaisant, il serait intéressant de pouvoir distinguer ces deux sondes sur la biochips. Pour y parvenir, nous profitons de la présence de la biotine en 3' au niveau de la sonde chimérique. Deux possibilités nous sont offertes : soit nous mettons le damier en présence d'un conjugué streptavidine couplée à la cyanine 5 (la streptavidine reconnaît la biotine) et une lecture au scanner à fluorescence s'effectue dans le canal qui correspond à ce fluorochrome ; soit le damier est mis en présence d'anticorps anti-biotine couplés à l'or et dès lors, la révélation se fait grâce aux précipités d'argent (voir introduction au point IV et matériel et méthodes au point VI.3.d). Les damiers sont ensuite passés au scanner à diapositives Nikonscan.

Avant de se lancer dans l'expérience, un test est effectué pour évaluer la première proposition. Des lames qui viennent d'être hybridées avec des sondes IVcya/biot épuisées sur billes sont mises en contact avec un conjugué streptavidine – cyanine 5. Ce dernier vient se fixer à la biotine des sondes non épuisées. Ensuite une lecture en fluorescence est réalisée à la fois en cyanine 3 et en cyanine 5. Le but de test est de vérifier si il y a oui ou non interférence entre ces deux fluorochromes. Si il n'y en a pas, cela permettrait de distinguer les sondes clivées et non clivées en effectuant ces deux lectures l'une après l'autre (Figure III.12.). Suite à la lecture en cyanine 3, on voit clairement les contrôles positifs ce qui est tout à fait normal car du cible contrôle positif avec une cyanine 3 en 5' est ajouté au mix d'hybridation. On peut également voir apparaître les spots au niveau des capteurs de l'invertase ce qui est tout à fait logique aussi ; en effet, les sondes clivées ainsi que les sondes non clivées (toujours présentes à cause d'un épuisement insatisfaisant) portant une cyanine 3 sont venues s'hybrider. Les contrôles de fixation, eux, ne sont pas allumés ce qui est aussi normal car lors de la révélation, c'est un conjugué streptavidine –

cyanine 5 qui est utilisé. On peut donc dire qu'il n'y a pas de problèmes d'interférences à ce niveau.

Lors de la lecture en cyanine 5, les contrôles positifs ne s'allument pas cette fois mais c'est tout également tout à fait normal vu que le cible associé n'a qu'une cyanine 3. Les contrôles de fixation, eux s'allument et ceci s'explique par l'utilisation d'un conjugué avec une cyanine 5 lors de la révélation. Un problème se situe au niveau des capteurs de l'invertase ; ils ne s'allument déjà plus suite à un seul épuisement. Sachant que l'épuisement est loin d'être satisfaisant et encore moins après un seul passage sur les billes, des sondes chimériques présentes, révélées avec le conjugué streptavidine – cyanine 5, auraient du être détectées via la longueur d'onde choisie.

Nous nous sommes donc tournés vers la deuxième possibilité impliquant la révélation à l'argent.

### a) Description

Les sondes intactes portant une cyanine et une biotine (IVcya/biot) ainsi que les sondes portant une cyanine (IVcya), toutes deux diluées dans du CB 1X, subissent l'étape d'épuisement sur billes au cours de laquelle, théoriquement, l'ensemble des sondes possédant une biotine est retenu. En pratique, ces sondes sont placées avec une quantité déterminée de billes magnétiques coatées à la streptavidine (22,5 µg) et du « tampon billes » 2X. Un premier épuisement a lieu pendant 10 minutes à température ambiante et sous légère agitation. Suite à ce premier épuisement, le surnageant récupéré est soit hybridé soit il subit un ou plusieurs passages sur billes. Pour ces épuisements suivants, dans le but de ne pas augmenter le volume, il est nécessaire que le surnageant des billes soit retiré. Suite au dernier épuisement, le surnageant est hybridé sur biochips.

Pour réaliser cette hybridation, un mix comprenant le surnageant obtenu suite à l'étape d'épuisement, de la solution d'hybridation et également du cible contrôle positif nécessaire à vérifier le bon déroulement de l'hybridation. Ce mix est déposé sur damier et ensuite, les lames sont placées dans un four d'hybridation à 60°C pendant deux heures. Pour finir, des lavages post – hybridation ont lieu jusqu'à l'incubation avec le conjugué. Une lecture au scanner en cyanine 3 est alors réalisée. Suite à celle-ci, des lavages sont réalisés pour que les lames soient replacées en condition, comme décrit au point VI.3.d. du matériel et méthodes, et un anticorps anti-biotine couplé à l'or est incubé. Ensuite, d'autres lavages sont réalisés puis une seconde incubation avec un mélange constitué des solutions

A et B est effectuée. Un précipité d'argent visible à l'œil nu se dépose alors à l'endroit où la biotine est présente.

### b) Observations

La coloration à l'argent apporte-t-elle des informations à ce niveau ? Non puisque, par la détection à l'argent, les spots ne s'allument plus après même un seul épuisement (Figure III.13.). Ceci n'est donc pas le reflet de ce qui se passe réellement vu le manque connu d'efficacité de l'épuisement : en effet, suite à la lecture en cyanine 3, on remarque que après un épuisement, le niveau de gris est proche du 100% n'ayant pas subi d'épuisement. En ce qui concerne les contrôles positifs d'hybridation, il est tout à fait normal qu'ils ne s'allument pas vu qu'ils ne sont pas biotinylés et donc que l'anticorps conjugué à l'or ne les reconnaît pas.

### c) Conclusion

Malheureusement, ni la coloration à l'argent ni le recours à un conjugué streptavidine – cyanine 5 n'ont apporté de solution à une distinction possible entre la sonde clivée et la sonde chimérique intacte.

La coloration à l'argent n'a probablement pas donné le résultat voulu en raison d'une sensibilité plus faible de la technique. En effet, la sonde ne comporte qu'une seule biotine et, suite à un épuisement, la quantité de sondes ne semble plus suffisante que pour être détectée par la coloration à l'argent.

## II. Préliminaires sur le Roundup Ready Soja

### II.1. Conception théorique de la sonde chimérique

Le choix de la sonde chimérique est une étape primordiale pour un bon fonctionnement de la CPT. La séquence de celle-ci doit être spécifique d'une partie du génome du soja modifié considéré. Pour ce faire, il est préférable de choisir cette séquence ADN-ARN-ADN dans un fragment de bordure c'est-à-dire aux jonctions entre la plante et le transgène car les jonctions sont spécifiques d'un seul OGM.

En ce qui concerne la taille de la sonde, elle doit être suffisamment importante dans le but de permettre la détection de la sonde clivée après une hybridation. Toutefois, il ne faut pas qu'elle soit trop grande ce qui risquerait de conduire à la formation de structures secondaires. Ces dernières seraient problématiques dans la réaction de CPT : en cas de repliement de la sonde incriminant les bases d'ARN, la RNase H risque de venir cliver la sonde alors que le cible est absent et donc donner lieu à des faux-positifs. Cependant, il est relativement difficile d'éviter toute structure secondaire. Dans notre cas, la taille choisie est de 25 bases pour la sonde chimérique ce qui donnera lieu à une sonde clivée à détecter de 18 bases.

Pour sélectionner la sonde la plus idéale possible, différents critères sont imposés. Pour une raison pratique, les 4 bases successives d'ARN sont des purines c'est-à-dire des adénines (A) ou des guanines (G). En effet, la RNase A ne peut cliver efficacement les purines, ce qui nous évite de travailler dans des conditions RNase free. De plus, ces 4 bases doivent être légèrement décentrées au sein de la sonde pour que la sonde à détecter soit la plus longue possible mais pas trop afin que les températures de melting soient les plus différentes possibles et ainsi permettre le détachement spontané des deux sondes clivées. Une nouvelle sonde chimérique peut alors venir s'hybrider au cible.

Dans un premier temps, différentes jonctions ont été envisagées : jonction plante – insert (P35S), jonction ADN réarrangé – plante, jonction CP4 EPSPS – ADN réarrangé et jonction T-nos – partie CP4 EPSPS (Figure III.14).

Chacune de ces séquences au niveau des jonctions ont été soumises au programme informatique « oligo 6 ». Celui-ci renseigne sur les éventuelles structures secondaires, sur la formation de dimères ou encore sur la température de melting.

Dès que l'ensemble des jonctions a subi ce premier programme de prédiction, un premier tri est réalisé et seules les sondes répondant aux contraintes décrites ci-dessus vont subir un second programme plus performant, « mfold ». Il est disponible sur internet (<http://bioinfo.math.rpi.edu/~mfold>) et donne une prédiction des structures que la sonde peut prendre et ce, à une température déterminée. Pour informations, le programme est basé sur la minimisation d'énergie libre. Cette approche considère l'acide nucléique en tant que structure isolée et stable, sans tenir compte des autres facteurs qui pourraient intervenir pour influencer la structure (Jaeger *et al.*, 1989). L'énergie libre est une constante thermodynamique qui donne la quantité d'énergie requise ou libérée par une réaction donnée. Elle est mesurée en kcal/mole et est symbolisée par  $\Delta G$ . Les réactions qui demandent de l'énergie ont une valeur de  $\Delta G$  positive alors que celles qui libèrent de l'énergie ont un  $\Delta G$  négatif. Au total l'énergie doit être libérée pour former une structure de bases appariées. La stabilité de la structure est déterminée par la quantité d'énergie libre libérée.

Au cours du programme, les paramètres énergétiques stimulent le repliement à 37°C. Cependant, le repliement peut aussi être prédit à d'autres températures. Dans notre cas, il semblait opportun de tester une température de 70°C vu que la réaction CPT a généralement lieu autour de cette température.

Notre choix s'est finalement porté sur la jonction plante – P35S dont la séquence est la suivante : 5' TAG GGA ACC CAA ATG Gaa aaG GAA G 3' (bases ARN en minuscules). Le programme « oligo 6 » pour ce choix de sonde n'a pas mis en évidence de structures secondaires stables en épingle, mieux connu sous le nom d' « hairpin » (Figure III.15). Selon le programme « mfold », trois structures sont prédites à 70°C (Figure III.16.) et quatre à 37°C. Les structures secondaires possibles ne concernent que peu de bases et surtout n'impliquent pas les bases ARN. De plus, l'énergie libre de ces structures varie entre 0,4 Kcal/mole à 1,3 Kcal/mole pour une température de 70°C et entre -1,2 et 0,7 Kcal/mole à 37°C. Or comme nous venons de l'expliquer plus haut, plus le  $\Delta G$  est élevé, plus c'est instable.

Pour finir, il faut s'assurer que la séquence de la sonde entière ainsi que la sonde clivée soit effectivement bien spécifique de l'organisme considéré. C'est pourquoi, elles

ont été testées dans une banque de données « Blast » pour confirmer cette spécificité. Il s'est avéré que la sonde chimérique choisie ne reconnaît rien en dehors du soja modifié.

## **II.2. Premier test d'amplification par la CPT**

Les tests d'épuisement n'ayant pas donnés les résultats escomptés, rien ne nous permet de dire quoi que ce soit sur le déroulement de la CPT. Or, il serait intéressant de vérifier si le choix de la sonde chimérique a été judicieux. Pour cela, une CPT suivie d'une détection sur gel de polyacrylamide dénaturant est réalisée ; celle-ci nous permettra de vérifier le déroulement de la CPT. Ceci implique l'utilisation d'une sonde marquée radioactivement. De plus, en raison des résultats obtenus lors des épuisements sur billes magnétiques coatées à la streptavidine pour lesquels cela se déroule mieux en absence de triton, il serait intéressant de réaliser l'expérience avec du tampon CB « conforme » et, en parallèle, avec du tampon CB n'en contenant pas.

### **a) Description de l'expérience**

L'ADN cible RRS (5 µl) est dilué dans du tampon CB 1X avec ou sans triton à différentes concentrations ;  $1.10^{-14}$  moles,  $1.10^{-17}$  moles et  $1.10^{-20}$  moles. Ce dernier est ajouté à 10 µl mix comprenant la sonde chimérique spéciale marquée radioactivement au  $^{32}\text{P}$  correspondant à environ 25000 coups par minute ; du CB 10X avec ou sans triton ; la RNase H (5,7 pmoles) et de l'eau distillée. En parallèle, deux contrôles sont réalisés : C1 ne contenant ni cible ni enzyme, sert à s'assurer de l'intégralité de la sonde tout au long de la réaction ; C2 ne contenant pas de cible, sert à vérifier la spécificité de l'action de l'enzyme.

La réaction se déroule 30 minutes à 70°C. Une fois que la réaction est stoppée, 15 µl de bleu sont alors ajoutés à chacun des échantillons. Ensuite, avant de déposer sur gel de polyacrylamide dénaturant, une dénaturation de 10 minutes à 94°C est effectuée dans le but de déplier toutes structures secondaires éventuelles et d'éliminer les dimères potentiels.

Suite à cela, les différents échantillons sont placés sur gel et la migration a lieu pendant 3 heures à 200 V. Suite à cela, le gel est séché et une analyse est réalisée grâce à

un Instant Imager qui permet de visualiser les bandes de migration de la sonde marquée ainsi qu'une quantification de ces bandes.

#### b) Observations

L'Instant Imager permet d'analyser le gel polyacrylamide 20% en détectant la migration des brins d'ADN comme représenté à la figure III.17 et en quantifiant ces bandes. A partir de là, un pourcentage de sonde clivée peut être calculé.

En ce qui concerne les contrôles C1 et C2, ils semblent être corrects. En effet, en C1, que ce soit en présence ou non de triton, la sonde n'est pas clivée ce qui prouve son intégrité. Quant à C2, en absence de triton, la sonde est également laissée intacte. Toutefois on peut noter qu'en présence de triton une seconde bande apparaît très légèrement. Ceci pourrait signifier qu'un peu de sonde a été clivée lors de la réaction.

Lorsque l'on compare les résultats obtenus avec un tampon CB contenant du triton et un n'en contenant pas, on constate clairement que le clivage de la sonde n'a pas lieu lorsque le triton est absent. Par contre, en présence de triton, la sonde est effectivement bien clivée. Il est nécessaire de signaler que la bande du test 1 sans triton apparaît un peu plus bas. Toutefois, le front de migration nous apparaît également plus bas à cet endroit. C'est pourquoi nous assimilons cette bande à de la sonde non clivée.

Au niveau des différentes concentrations, en condition avec triton, il semblerait que les pourcentages de sondes clivées soient plus importants lorsque les concentrations se situent entre  $10^{-14}$  moles et  $10^{-17}$  moles. A des concentrations inférieures ( $10^{-20}$  moles), ce pourcentage devient plus faible.

#### c) Conclusions

En ce qui concerne la question de savoir si le choix de la sonde chimérique est judicieux ou non, la réponse est positive. En effet, la sonde choisie conserve son intégrité lors de la réaction de la CPT ; C1 en est la preuve. De plus, il semblerait qu'il n'y ait pratiquement pas de formation de structures secondaires formées lors de la réaction au sein de la sonde. Pour réduire le clivage du contrôle C2, un « Hot start » avant la CPT pourrait être réalisé afin de déplier les structures secondaires potentielles.

Quant à la réalisation de la CPT en recourant à un tampon CB sans triton, elle ne peut être envisagée. Aucun clivage de la sonde chimérique n'a lieu dans ces conditions.



Ceci signifie donc qu'il va falloir soit revoir la composition du CB soit trouver une autre possibilité d'épuisement de la sonde chimérique non clivée si l'on veut pouvoir réaliser notre détection d'un échantillon positif (présence d'OGM) sur biochips sans risquer des faux-positifs.

## Conclusions et perspectives

---

La mise au point d'un procédé de détection des OGM recourant à la technique d'amplification de la CPT couplée à celle des biochips était l'objectif de ce mémoire. L'amplification par la CPT présente différents avantages vis-à-vis des autres techniques plus généralement employées telles la PCR en raison de sa moindre sensibilité aux contaminations et son caractère isothermal. Quant aux biochips, elles ont un avenir prometteur notamment dans le cadre de la détection des OGM où elles permettent d'en identifier plusieurs simultanément.

L'idée de base est d'utiliser une sonde chimérique c'est-à-dire composée d'ADN/ARN/ADN et spécifique de l'OGM. Cette sonde, marquée par une biotine en 3' et une cyanine 3 en 5', placée en excès en présence d'un cible complémentaire (à long terme, un échantillon positif) est clivée par la RNase H lors de la CPT. Suite à cette réaction, il y a une accumulation de sondes clivées mais des sondes non clivées peuvent toujours être présentes en solution. Afin de détecter uniquement les sondes clivées, il nous faut donc éliminer les sondes non clivées de la solution. Ce qui différencie les sondes non clivées des sondes clivées à détecter est la présence en 5' d'une biotine. Nous avons donc tenté de capter les sondes biotinylées grâce à des puits et ensuite à des billes magnétiques coatées à la streptavidine. Le surnageant récupéré suite à cet épuisement est alors hybridé sur biochips et la détection se fait via la cyanine 3.

Les deux étapes clés dans ce travail ont été la mise au point de la détection des produits de l'amplification et le choix de la sonde chimérique.

Les différentes mises au point de la détection des produits de l'amplification sur biochips ont été réalisées sur le gène de l'invertase du maïs. La première était de vérifier que la spécificité d'hybridation sur biochips s'effectuait correctement ce qui était le cas.

Une autre mise au point était celle de l'épuisement de la sonde non clivée qui est indispensable avant un quelconque travail sur la CPT. En effet, si cette étape ne s'effectue pas de manière satisfaisante, cela risque de poser des problèmes quant à l'interprétation du déroulement de la CPT. Les risques de faux-positifs seraient alors très élevés. Cette étape nous aura posé plus de problèmes qu'on ne l'aurait imaginer. Le principe était simple : ces sondes étaient retenues par leur biotine sur puits coatés à la streptavidine. Après avoir tester plusieurs paramètres (température, temps d'incubation, agitation, concentration en

sondes), les résultats de fixation étaient loin de ceux escomptés : on n'atteignait que des pourcentages de fixation aux alentours des 60%.

C'est alors que nous avons pensé réaliser cette étape sur billes magnétiques coatées à la streptavidine. Ceci permettait d'ajuster la quantité de billes si nécessaire, une dispersion homogène et donc une meilleure accessibilité aux streptavidines. On a pu constater que ce qui gênait la fixation dans ce cas, c'était le triton contenu dans le tampon CB. En absence de triton, un meilleur épuisement se réalisait ; on atteignait environ 75% de fixation.

Parallèlement à ces mises au point, le choix de la sonde chimérique spécifique du RRS a été réalisé. Celle-ci devait être spécifique de l'OGM considéré mais également répondre à une série de critères comme posséder le noyau ARN décentré et constitué de purines, éviter les structures secondaires stables, ... Une sonde a été choisie à la jonction plante-P35S.

Vu l'influence de triton sur les tests d'épuisements, nous avons voulu voir si il était indispensable au bon déroulement de la CPT. Pour cela, une CPT avec détection sur gel de polyacrylamide a été réalisée avec la sonde chimérique marquée radioactivement. Cette expérience permettait également de se rendre compte si le choix de la sonde chimérique s'avérait judicieux. L'expérience nous a démontré d'une part que le choix de la sonde était avisé et d'autre part que la CPT nécessite un tampon CB contenant du triton.

En conclusion, le problème majeur à l'élaboration de l'approche générale est l'incompatibilité entre la CPT et la technique d'épuisement utilisée.

Plusieurs voies pourraient être explorées pour résoudre ce problème : Afin de permettre la séparation entre les sondes intactes et clivées, on pourrait envisager de réaliser une préhybridation du produit de la CPT au cours de laquelle la sonde intacte viendrait s'hybrider à un capteur spécifique de la partie manquante chez la sonde clivée. Ainsi donc, la sonde intacte serait hybridée et la clivée serait récupérée dans le surnageant et hybridée sur biochips. Cependant, il serait nécessaire de revoir à la hausse la taille de la sonde afin de permettre cette préhybridation. En effet, la taille de cette partie manquante n'est que de 7 bases ; ceci est un peu court pour permettre une hybridation.

Une autre possibilité est de recourir à l'utilisation d'anticorps fixés sur un support ou au sein d'une colonne qui retiendraient les sondes intactes et ensuite seules les sondes clivées seraient récupérées et placées sur biochips.

La réoptimalisation du tampon CB sans triton pourrait consister en une autre voie mais plus risquée vu la sensibilité de la RNase H.

Une fois cette étape mise au point la détection du soja Roundup Ready pourra être finalisée et la technique pourra être adaptée à la détection d'autres OGM.

- *Un outil pour analyser plusieurs milliers de gènes simultanément*, Biofutur, 166, 2-14, 1997.
- Abravaya K., J. J. Carrino *et al.*, *Detection of point mutations with a modified ligase chain reaction (Gap- LCR)*, Nucleic Acids Res, 23, 675-82., 1995.
- Ahmed F. E., *Detection of genetically modified organisms in foods*, Trends in Biotechnology, 20, 215-23, 2002.
- Alexandre I., S. Hamels *et al.*, *Colorimetric silver detection of DNA microarrays*, Anal Biochem, 295, 1-8., 2001.
- Alexandre I., N. Zammattéo *et al.*, *Quantitative determination of CMV DNA using a combination of competitive PCR amplification and sandwich hybridization*, Biotechniques, 25, 676-83., 1998.
- Alexandre I., N. Zammattéo *et al.*, *Comparison of three luminescent assays combined with a sandwich hybridization for the measurement of PCR-amplified human cytomegalovirus DNA*, J Virol Methods, 66, 113-22., 1997.
- Beggs M. L., M. D. Cave *et al.*, *Characterization of Mycobacterium tuberculosis complex direct repeat sequence for use in cycling probe reaction*, J Clin Microbiol, 34, 2985-9., 1996.
- Bekkaoui F., J. P. McNevin *et al.*, *Rapid detection of the mecA gene in methicillin resistant staphylococci using a colorimetric cycling probe technology*, Diagn Microbiol Infect Dis, 34, 83-90., 1999.
- Bekkaoui F., I. Poisson *et al.*, *Cycling probe technology with RNase H attached to an oligonucleotide*, Biotechniques, 20, 240-8., 1996.
- Bellis P. and M. Casellas, *La puce ADN : un multi-réacteur de paillasse*, Médecine/sciences, 13, 1317-24, 1997.
- Bertheaux Y. and A. Diolez, *Les aliments passés au crible*, Biofutur, 192, 28-32, 1999.
- Bustin S. A., *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*, J Mol Endocrinol, 25, 169-93., 2000.
- Cahill P., K. Foster *et al.*, *Polymerase chain reaction and Q beta replicase amplification*, Clin Chem, 37, 1482-5., 1991.
- Carrino J. J. and H. H. Lee, *Nucleic acid amplification methods*, J. Microbiol. Methods, 23, 3-20, 1995.
- Chassy B. and I. Munro, *Evolution d'un principe fondateur*, La Recherche, 339, 70-72, 2001.
- Cheung V. G., M. Morley *et al.*, *Making and reading microarrays*, Nat Genet, 21, 15-9., 1999.
- Delpech M., *[DNA chips]*, Ann Biol Clin (Paris), 58, 29-38., 2000.

- Duck P., G. Alvarado-Urbina *et al.*, *Probe amplifier system based on chimeric cycling oligonucleotides*, *Biotechniques*, 9, 142-8., 1990.
- Edwards M. C. and R. A. Gibbs, *Multiplex PCR: advantages, development, and applications*, *PCR Methods Appl*, 3, S65-75., 1994.
- Erhardt A., S. Schaefer *et al.*, *Quantitative assay of PCR-amplified hepatitis B virus DNA using a peroxidase-labelled DNA probe and enhanced chemiluminescence*, *J Clin Microbiol*, 34, 1885-91., 1996.
- Fini F., G. Gallinella *et al.*, *Development of a chemiluminescence competitive PCR for the detection and quantification of parvovirus B19 DNA using a microplate luminometer*, *Clin Chem*, 45, 1391-6., 1999.
- Fong W. K., Z. Modrusan *et al.*, *Rapid solid-phase immunoassay for detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus using cycling probe technology*, *J Clin Microbiol*, 38, 2525-9., 2000.
- Gianessi L. P. and J. E. Carpenter, *Agricultural biotechnology : benefits of transgenic soybeans*, National Center for Food and Agricultural Policy, 2000.
- Gilliland G., S. Perrin *et al.*, *Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 2725-9., 1990.
- Godfroid E., *Les puces ADN*, *Chimie nouvelle*, 18, 3113-19, 2000.
- Hamels S., J. L. Gala *et al.*, *Consensus PCR and microarray for diagnosis of the genus Staphylococcus, species, and methicillin resistance*, *Biotechniques*, 31, 1364-6, 1368, 1370-2., 2001.
- Hill C. S., *Molecular diagnostics for infectious diseases*, *Journal of Clinical Ligand Assay*, 19, 43-52, 1996.
- Hübner P., E. Studer *et al.*, *Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified organisms in food*, *Food control*, 10, 353-358, 1999b.
- Inoue H., Y. Hayase *et al.*, *Sequence-dependent hydrolysis of RNA using modified oligonucleotide splints and RNase H*, *FEBS Lett*, 215, 327-30., 1987.
- Jaeger J. A., D. H. Turner *et al.*, *Improved predictions of secondary structures for RNA*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 7706-10., 1989.
- Kanaya S. and M. Itaya, *Expression, purification, and characterization of a recombinant ribonuclease H from Thermus thermophilus HB8*, *J Biol Chem*, 267, 10184-92., 1992.
- Kurian K. M., C. J. Watson *et al.*, *DNA chip technology*, *J Pathol*, 187, 267-71., 1999.

- Lizardi P. M. and F. R. Kramer, *Exponential amplification of nucleic acids: new diagnostics using DNA polymerases and RNA replicases*, Trends Biotechnol, 9, 53-8., 1991.
- Marris C., *OGM : comment analyser les risques?*, Biofutur, 195, 44-47, 1999.
- Martin C. S., L. Butler *et al.*, *Quantitation of PCR products with chemiluminescence*, Biotechniques, 18, 908-13., 1995.
- Modrusan Z., F. Bekkaoui *et al.*, *Spermine-mediated improvement of cycling probe reaction*, Mol Cell Probes, 12, 107-16., 1998.
- Mullis K. B. and F. A. Faloona, *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*, Methods Enzymol, 155, 335-50, 1987.
- Nakamura H., Y. Oda *et al.*, *How does RNase H recognize a DNA-RNA hybrid?*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 11535-11539, 1991.
- Newton C. R. and A. Graham, *PCR-Polymerase Chain Reaction*, BIOS Scientific, 1994.
- Perrier J.-J., *Vers de nouveaux gènes sélecteurs?*, Biofutur, 192, 22-26, 1999.
- Porschke D., *Elementary steps of base recognition and helix-coil transitions in nucleic acids*, 24, 191-218, 1977.
- Philipon P., *Les Européens se rebiffent*, Biofutur, 164, 12-15, 1997.
- Philipon P., *Aliments transgéniques : le doute s'installe*, Biofutur, 192, 16-20, 1999.
- Rasmussen S. R., M. R. Larsen *et al.*, *Covalent immobilization of DNA onto polystyrene microwells: the molecules are only bound at the 5' end*, Anal Biochem, 198, 138-42., 1991.
- Remacle J., N. Zammattéo *et al.*, *Les sondes à ADN, outils du futur*, Biofutur, 45-55, 1994.
- Renard P., I. Ernest *et al.*, *Development of a sensitive multi-well colorimetric assay for active NFkappaB*, Nucleic Acids Res, 29, E21., 2001.
- Richards J. C., *Gene probes*, Curr Opin Biotechnol, 2, 76-85., 1991.
- Salmon M., *La PCR en temps réel*, Biofutur, 219, 1-8, 2002.
- Schweiger B., I. Zadow *et al.*, *Application of a fluorogenic PCR assay for typing and subtyping of influenza viruses in respiratory samples*, J Clin Microbiol, 38, 1552-8., 2000.
- USDA, *Agricultural statistics*, National Agricultural Statistics Service,
- Uyttendaele M., R. Schukink *et al.*, *Detection of Campylobacter jejuni added to foods by using a combined selective enrichment and nucleic acid sequence-based amplification (NASBA)*, Appl Environ Microbiol, 61, 1341-7., 1995a.

- Uyttendaele M., R. Schukkink *et al.*, *Development of NASBA, a nucleic acid amplification system, for identification of Listeria monocytogenes and comparison to ELISA and a modified FDA method*, Int J Food Microbiol, 27, 77-89., 1995b.
- Wal J.-M., *OGM et allergies : constater ou prédire?*, Le Recherche, 339, 87-89, 2001.
- Warnon S., N. Zammattéo *et al.*, *Colorimetric detection of the tuberculosis complex using cycling probe technology and hybridization in microplates*, Biotechniques, 28, 1152-6, 1159-60., 2000.
- Wetmur J. G., *DNA probes: applications of the principles of nucleic acid hybridization*, Crit Rev Biochem Mol Biol, 26, 227-59, 1991.
- Wetmur J. G. and N. Davidson, *Kinetics of renaturation of DNA*, J. Mol. Biol., 31, 349-370, 1968.
- Windels P., I. Taverniers *et al.*, *Characterisation of the Roundup Ready soybean insert*, Eur Food Res Technol, 213, 107-112, 2001.
- Wolcott M. J., *Advances in nucleic acid-based detection methods*, Clin Microbiol Rev, 5, 370-86., 1992.
- Wolfram H., *Foods derived from genetically modified organisms and detection methods (BATS, report prepared in collaboration with the Swiss Federal Office of Public Health)*, <http://www.bats.ch/abstr/297intro.htm#1>, 1997.
- Wu D. Y. and R. B. Wallace, *The ligation amplification reaction (LAR)--amplification of specific DNA sequences using sequential rounds of template-dependent ligation*, Genomics, 4, 560-9., 1989.